

## Susu bubuk





© BSN 2015

Hak cipta dilindungi undang-undang. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh isi dokumen ini dengan cara dan dalam bentuk apapun serta dilarang mendistribusikan dokumen ini baik secara elektronik maupun tercetak tanpa izin tertulis dari BSN

BSN  
Email: [dokinfo@bsn.go.id](mailto:dokinfo@bsn.go.id)  
[www.bsn.go.id](http://www.bsn.go.id)

Diterbitkan di Jakarta



## Daftar isi

Daftar isi.....	i
Prakata .....	ii
1 Ruang lingkup.....	1
2 Acuan normatif.....	1
3 Istilah dan definisi .....	1
4 Komposisi .....	2
5 Klasifikasi.....	2
6 Syarat mutu .....	2
8 Cara uji .....	5
9 Syarat lulus uji .....	5
10 Higiene.....	5
11 Pengemasan.....	5
12 Syarat penandaan .....	5
Lampiran A .....	6
Bibliografi .....	40
Tabel 1 – Syarat mutu susu bubuk .....	3



## Prakata

Standar Nasional Indonesia (SNI) *Susu bubuk* ini merupakan revisi SNI 01 – 2970 – 2006 Susu bubuk. Standar ini direvisi dan dirumuskan dengan tujuan sebagai berikut :

1. Menyesuaikan standar dengan perkembangan teknologi terutama dalam metode uji dan persyaratan mutu;
2. Menyesuaikan standar dengan peraturan-peraturan baru yang berlaku;
3. Melindungi kesehatan dan kepentingan konsumen;
4. Menjamin perdagangan pangan yang jujur dan bertanggung jawab;
5. Mendukung perkembangan dan diversifikasi produk industri susu olahan.

Standar ini dirumuskan dengan memperhatikan ketentuan pada :

1. Undang-Undang Republik Indonesia No. 8 Tahun 1999 tentang Perlindungan Konsumen.
2. Undang-Undang Republik Indonesia No. 36 Tahun 2009 tentang Kesehatan.
3. Undang-Undang Republik Indonesia No. 18 Tahun 2012 tentang Pangan.
4. Undang-Undang Republik Indonesia No. 3 Tahun 2014 tentang Perindustrian.
5. Undang-Undang Republik Indonesia No. 20 Tahun 2014 tentang Standardisasi dan Penilaian Kesesuaian
6. Peraturan Pemerintah Republik Indonesia No. 69 Tahun 1999 tentang Label dan Iklan Pangan.
7. Peraturan Pemerintah Republik Indonesia No. 28 Tahun 2004 tentang Keamanan, Mutu, dan Gizi Pangan.
8. Peraturan Menteri Perindustrian Republik Indonesia No. 24/M-IND/PER/2/2010 tentang Pencantuman Logo Tara Pangan dan Kode Daur Ulang Pada Kemasan Pangan Dari Plastik.
9. Peraturan Menteri Perindustrian Republik Indonesia Nomor 75/M-IND/PER/7/2010 tentang Pedoman Cara Produksi Pangan Olahan yang Baik (*Good Manufacturing Practices*).
10. Peraturan Menteri Kesehatan Republik Indonesia No. 033 Tahun 2012, tentang Bahan Tambahan Pangan.
11. Surat Keputusan Kepala Badan Pengawas Obat dan Makanan Republik Indonesia No. HK.00.05.52.4040 Tahun 2006 tentang Kategori Pangan.
12. Peraturan Kepala Badan Pengawas Obat dan Makanan Republik Indonesia No. HK.00.06.1.52.4011 Tahun 2009 tentang Penetapan Batas Maksimum Cemaran Mikroba dan Kimia dalam Makanan.

Standar ini dirumuskan oleh **Subkomite Teknis 67-04-S1, Minuman Kementerian Perindustrian**, yang telah dibahas melalui rapat teknis, dan disepakati dalam rapat konsensus pada tanggal 25 Februari 2014 di Jakarta. Hadir dalam rapat tersebut wakil dari konsumen, produsen, lembaga pengujian, lembaga ilmu pengetahuan dan teknologi, Badan Pengawas Obat dan Makanan, dan instansi terkait lainnya.

Standar ini telah melalui proses jajak pendapat pada 27 Februari 2015 sampai 26 April 2015 dengan perpanjangan 1 (satu) bulan sampai tanggal 25 Mei 2015 dengan hasil akhir RASNI.



## Susu bubuk

### 1 Ruang lingkup

Standar ini menetapkan istilah dan definisi, klasifikasi, syarat mutu, pengambilan contoh, dan cara uji susu bubuk.

Standar ini berlaku untuk susu bubuk *plain* yang ditujukan untuk pengguna akhir yang selanjutnya disebut susu bubuk.

### 2 Acuan normatif

Pedoman ini tidak dapat dilaksanakan tanpa menggunakan dokumen referensi di bawah ini. Untuk acuan bertanggal, hanya edisi yang disebutkan yang berlaku. Untuk acuan yang tidak bertanggal, edisi terakhir dari (termasuk amandemen lain) yang berlaku.

SNI 0428, *Petunjuk pengambilan contoh padatan*.

SNI ISO 4831:2012, *Mikrobiologi bahan pangan dan pakan – Metode horizontal untuk deteksi dan enumerasi koliform – Teknik Angka Paling Mungkin (APM)*.

SNI ISO 6887-1:2012, *Mikrobiologi bahan pangan dan pakan – Penyiapan contoh uji, suspensi awal dan pengenceran desimal untuk pengujian mikrobiologi – Bagian 1 : aturan umum untuk penyiapan suspensi awal dan pengenceran decimal*.

SNI ISO 6887-5:2012, *Mikrobiologi bahan pangan dan pakan – Penyiapan contoh uji, suspensi awal dan pengenceran desimal untuk pengujian mikrobiologi – Bagian 5 : aturan khusus untuk penyiapan susu dan produk susu*.

SNI ISO 6888-1:2012, *Mikrobiologi bahan pangan dan pakan – Metoda horizontal untuk enumerasi staphylococci koagulasi-positif (Staphylococcus aureus dan spesies lain) – Bagian 1: Teknik menggunakan media Baird Parker Agar*.

### 3 Istilah dan definisi

#### 3.1

##### **susu bubuk**

produk susu yang diperoleh dengan cara mengurangi sebagian besar air melalui proses pengeringan susu segar dan atau susu rekombinasi, atau pencampuran kering (*dry blend*), dengan atau tanpa penambahan vitamin, mineral, unsur gizi lainnya, dan bahan tambahan pangan yang diizinkan.

**CATATAN** susu rekombinasi adalah produk susu berbentuk cair yang diperoleh dari campuran komponen susu (padatan susu, krim) dan atau susu segar dan atau susu *full cream*, atau keduanya

#### 3.1.1

##### **susu bubuk *full cream***

susu bubuk yang tidak dikurangi lemaknya



### 3.1.2

#### **susu bubuk semi skim**

susu bubuk yang dalam prosesnya dikurangi sebagian lemak susunya

### 3.1.3

#### **susu bubuk skim**

susu bubuk yang dalam prosesnya dikurangi sebagian besar lemaknya

## **4 Komposisi**

### **4.1 Bahan baku**

- a) Susu segar;
- b) susu full cream;
- c) susu skim; dan
- d) krim.

### **4.2 Bahan tambahan pangan**

Bahan tambahan pangan yang diizinkan untuk susu bubuk sesuai dengan ketentuan yang berlaku, kecuali pewarna dan perisa.

## **5 Klasifikasi**

- a) susu bubuk full cream;
- b) susu bubuk semi skim;
- c) susu bubuk skim.

## **6 Syarat mutu**

Syarat mutu susu bubuk sesuai Tabel 1 di bawah ini.



Tabel 1 – Syarat mutu susu bubuk

No.	Kriteria uji	Satuan	Persyaratan		
			Susu bubuk <i>full cream</i>	Susu bubuk semi skim	Susu bubuk skim
1	Keadaan				
1.1	Bau	-	normal	normal	normal
1.2	Rasa	-	normal	normal	normal
1.3	Warna	-	normal	normal	normal
2	Air	% (b/b)	maks. 5	maks. 5	maks. 5
3	Lemak susu <sup>1)</sup>	% (b/b)	min.26 dan kurang dari 42	lebih dari 1,5 dan kurang dari 26	maks. 1,5
4	Protein (N x 6,38)	% (b/b) <sup>2)</sup>	min. 32	min. 32	min. 32
5	<i>Scorched particles</i>	-	maks. disc B	maks. disc B	maks. disc B
6	Indeks ketidak larutan	mL	maks. 1,0	maks. 1,0	maks. 1,0
7	Cemaran logam				
7.1	Timbal (Pb) <sup>3)</sup>	mg/kg	maks. 0,02	maks. 0,02	maks. 0,02
7.2	Kadmium (Cd)	mg/kg	maks. 0,2	maks. 0,2	maks. 0,2
7.3	Timah (Sn)	mg/kg	maks. 40,0 / 250,0 <sup>4)</sup>	maks. 40,0 / 250,0 <sup>4)</sup>	maks. 40,0 / 250,0 <sup>4)</sup>

"Hak Cipta Badan Standardisasi Nasional, copy standar ini dibuat untuk penayangan di website Akses SNI dan tidak untuk dikomersilkan"



Tabel 1 (lanjutan)

No.	Kriteria uji	Satuan	Persyaratan		
			Susu bubuk <i>full cream</i>	Susu bubuk semi skim	Susu bubuk skim
8.4	Merkuri (Hg) <sup>3)</sup>	mg/kg	maks. 0,03	maks. 0,03	maks. 0,03
9	Cemaran arsen (As) <sup>3)</sup>	mg/kg	maks. 0,1	maks. 0,1	maks. 0,1
10	Cemaran mikroba				
10.1	Angka lempeng total	koloni/g	maks. $5 \times 10^4$	maks. $5 \times 10^4$	maks. $5 \times 10^4$
10.2	Coliform <sup>5)</sup>	APM/g	maks. 10	maks. 10	maks. 10
10.3	<i>Salmonella</i> sp.	-	negatif/ 25 g	negatif/ 25 g	negatif/ 25 g
10.4	<i>Staphylococcus aureus</i>	koloni/g	maks. $1 \times 10^2$	maks. $1 \times 10^2$	maks. $1 \times 10^2$
11	Aflatoksin M <sub>1</sub>	µg/kg	maks. 5	maks. 5	maks. 5
CATATAN: <sup>1)</sup> Dihitung sebagai total lemak <sup>2)</sup> Dihitung dalam padatan susu tanpa lemak <sup>3)</sup> Dihitung terhadap produk yang siap dikonsumsi <sup>4)</sup> Kadar Sn susu bubuk yang dikemas dalam kaleng <sup>5)</sup> Jika pengujian <i>Enterobacteriaceae</i> menunjukkan hasil negatif per 2x1 g maka tidak diperlukan pengujian koliform					

## 7 Pengambilan contoh

Cara pengambilan contoh sesuai dengan SNI 0428.



## 8 Cara uji

Cara uji untuk susu bubuk seperti di bawah ini:

- a) Persiapan contoh sesuai Lampiran A.1
- b) Cara uji keadaan sesuai Lampiran A.2
  - Cara uji bau sesuai Lampiran A.2.1
  - Cara uji rasa sesuai Lampiran A.2.2
  - Cara uji warna sesuai Lampiran A.2.3
- c) Cara uji kadar air sesuai Lampiran A.3
- d) Cara uji kadar lemak susu sesuai Lampiran A.4
- e) Cara uji kadar protein (dalam padatan susu tanpa lemak) sesuai dengan:
  - Cara uji total padatan sesuai Lampiran A.5.1
  - Cara uji kadar protein dalam padatan susu tanpa lemak sesuai Lampiran A.5.2
- f) Cara uji *scorched particles* sesuai Lampiran A.6
- g) Cara uji indeks ketidaklarutan sesuai Lampiran A.7
- h) Cara uji cemaran logam sesuai Lampiran A.8
  - Cara uji timbal (Pb) dan kadmium (Cd) sesuai Lampiran A.8.1
  - Cara uji timah (Sn) sesuai Lampiran A.8.2
  - Cara uji merkuri (Hg) sesuai Lampiran A.8.3
- i) Cara uji cemaran arsen (As) sesuai Lampiran A.9
- j) Cara uji cemaran mikroba sesuai dengan:
  - Persiapan dan homogenisasi contoh untuk angka lempeng total sesuai Lampiran A.10.1, untuk pengenceran pada uji angka lempeng total, SNI ISO 6887-1: 2012 dan SNI ISO 6887-5: 2012 untuk pengenceran pada uji mikrobiologi selain angka lempeng total
  - Cara uji angka lempeng total sesuai Lampiran A.10.2
  - Cara uji coliform sesuai SNI ISO 4831:2012
  - Cara uji *Salmonella* sp. sesuai Lampiran A.10.3
  - Cara uji *Staphylococcus aureus* sesuai SNI ISO 6888-1: 2012
- k) Cara uji aflatoksin M<sub>1</sub> sesuai Lampiran A.11.

## 9 Syarat lulus uji

Produk dinyatakan lulus uji apabila memenuhi syarat mutu sesuai Tabel 1.

## 10 Higiene

Cara memproduksi produk yang higienis termasuk cara penyiapan dan penanganannya sesuai dengan ketentuan yang berlaku.

## 11 Pengemasan

Produk dikemas dalam wadah yang tertutup rapat, tidak dipengaruhi atau mempengaruhi isi, aman selama penyimpanan dan pengangkutan.

## 12 Syarat penandaan

Syarat penandaan sesuai dengan ketentuan yang berlaku tentang label dan iklan pangan.



**Lampiran A**  
(normatif)  
**Cara uji susu bubuk**

**A.1 Persiapan contoh**

Persiapan contoh terdiri atas persiapan contoh untuk uji mikrobiologi, uji organoleptik, dan uji kimia. Pengambilan contoh untuk uji mikrobiologi dilakukan pertama, kemudian dilanjutkan dengan pengambilan contoh untuk uji organoleptik dan uji kimia.

**A.1.1 Persiapan contoh untuk uji mikrobiologi**

Buka kemasan contoh susu bubuk dan ambil contoh secara aseptik sebanyak 400 g, kemudian tempatkan dalam botol contoh steril.

**A.1.2 Persiapan contoh untuk uji organoleptik**

Buka kemasan contoh susu bubuk dan ambil contoh secukupnya, kemudian tempatkan dalam botol contoh yang bersih dan kering.

**A.1.3 Persiapan contoh untuk uji kimia**

Buka kemasan contoh susu bubuk dan ambil contoh sebanyak 400 g, kemudian tempatkan dalam botol contoh yang bersih dan kering.

**A.2 Keadaan**

**A.2.1 Bau**

**A.2.1.1 Prinsip**

Pengamatan contoh uji dengan indera penciuman yang dilakukan oleh panelis yang terlatih atau kompeten untuk pengujian organoleptik.

**A.2.1.2 Cara kerja**

- a) Ambil contoh uji secukupnya dan letakkan di atas gelas arloji yang bersih dan kering;
- b) cium contoh uji untuk mengetahui baunya; dan
- c) lakukan pengerjaan minimum oleh 3 orang panelis yang terlatih atau 1 orang tenaga ahli.

**A.2.1.3 Cara menyatakan hasil**

- a) Jika tidak tercium bau asing, maka hasil dinyatakan "normal"; dan
- b) jika tercium bau asing, maka hasil dinyatakan "tidak normal".



## A.2.2 Rasa

### A.2.2.1 Prinsip

Pengamatan contoh uji dengan indera perasa yang dilakukan oleh panelis yang terlatih atau kompeten untuk pengujian organoleptik.

### A.2.2.2 Cara kerja

- Ambil contoh uji secukupnya dan letakkan di atas gelas arloji yang bersih dan kering;
- rasakan dengan indera pengecap (lidah); dan
- lakukan pengerjaan minimum oleh 3 orang panelis yang terlatih atau 1 orang tenaga ahli.

### A.2.2.3 Cara menyatakan hasil

- Jika tidak terasa rasa asing, maka hasil dinyatakan "normal"; dan
- jika terasa rasa asing, maka hasil dinyatakan "tidak normal".

## A.2.3 Warna

### A.2.3.1 Prinsip

Pengamatan contoh uji dengan indera penglihatan yang dilakukan oleh panelis yang terlatih atau kompeten untuk pengujian organoleptik.

### A.2.3.2 Cara kerja

- Ambil contoh uji secukupnya dan letakkan di atas gelas arloji yang bersih dan kering;
- amati dengan indera penglihatan (mata); dan
- lakukan pengerjaan minimum oleh 3 orang panelis yang terlatih atau 1 orang tenaga ahli.

### A.2.3.3 Cara menyatakan hasil

- Jika tidak terlihat warna asing, maka hasil dinyatakan "normal"; dan
- jika terlihat warna asing, maka hasil dinyatakan "tidak normal".

## A.3 Kadar air

### A.3.1 Prinsip

Kadar air dihitung berdasarkan bobot yang hilang selama pemanasan dalam oven pada temperatur  $(102 \pm 2) ^\circ\text{C}$  selama 2 jam .

### A.3.2 Peralatan

- Desikator yang berisi desikan;
- Botol timbang dengan penutup;
- Oven terkalibrasi dengan ketelitian  $1 ^\circ\text{C}$ ; dan
- Neraca analitik terkalibrasi dengan ketelitian 0,1 mg.



### A.3.3 Cara kerja

- Panaskan botol timbang beserta tutupnya dalam oven pada temperatur  $(102 \pm 2) ^\circ\text{C}$  selama lebih kurang satu jam dan dinginkan dalam desikator selama 45 menit kemudian timbang dengan neraca analitik (botol timbang dan tutupnya) ( $W_0$ );
- masukkan 1 g sampai dengan 3 g contoh ke dalam botol, tutup, dan timbang ( $W_1$ );
- panaskan botol timbang yang berisi contoh tersebut dalam keadaan terbuka dengan meletakkan tutup botol di samping oven di dalam oven pada temperatur  $(102 \pm 2) ^\circ\text{C}$  selama dua jam (dua jam setelah temperatur oven mencapai  $102 ^\circ\text{C}$ );
- tutup botol timbang ketika masih di dalam oven, pindahkan segera ke dalam desikator dan dinginkan selama 45 menit kemudian timbang ( $W_2$ );
- lakukan pekerjaan duplo;
- hitung kadar air dalam contoh.

#### A.3.3.1 Perhitungan

$$\text{Kadar air (\%)} = \left( \frac{W_1 - W_2}{W_1 - W_0} \right) \times 100\%$$

#### Keterangan:

$W_0$  adalah bobot botol timbang kosong dan tutupnya, dinyatakan dalam gram (g);

$W_1$  adalah bobot botol timbang, tutupnya, dan contoh sebelum dikeringkan, dinyatakan dalam gram (g);

$W_2$  adalah bobot botol timbang, tutupnya, dan contoh setelah dikeringkan, dinyatakan dalam gram (g).

#### A.3.3.2 Ketelitian

Kisaran hasil dua kali ulangan maksimum 5% dari nilai rata-rata hasil kadar air atau deviasi (RSD) maksimum 2%. Jika kisaran lebih besar dari 5% atau deviasi lebih besar dari 2%, maka uji harus diulang kembali.

### A.4 Kadar lemak susu

#### A.4.1 Prinsip

Lemak susu dalam contoh dihidrolisis dengan amonia dan alkohol kemudian diekstraksi dengan eter. Ekstrak eter yang diperoleh kemudian diuapkan sampai kering dalam pinggan aluminium dan kadar lemak susu dihitung secara gravimetri.

#### A.4.2 Peralatan

- Neraca analitik terkalibrasi dengan ketelitian 0,1 mg;
- Pipet volumetrik 25 mL;
- Penangas air;
- Labu ekstraksi / labu *Majonnier*;
- Sentrifus;
- Oven terkalibrasi dengan ketelitian  $1 ^\circ\text{C}$ ;
- Desikator yang berisi desikan;
- Pinggian aluminium atau labu lemak (*Majonnier*); dan
- Gelas ukur.



### A.4.3 Pereaksi

- a) Amonium hidroksida ( $\text{NH}_4\text{OH}$ ) pekat;
- b) Indikator fenolftalein 0,5%;
- c) Etil alkohol 95%;
- d) Etil eter, bebas peroksida;
- e) Petroleum eter; dan
- f) Air suling.

### A.4.4 Cara kerja

- a) Timbang 1 g contoh susu bubuk ke dalam labu ekstraksi (W), tambahkan 10 mL air suling, aduk sehingga membentuk pasta, dan panaskan jika diperlukan;
- b) tambahkan 1 mL sampai dengan 25 mL amonium hidroksida pekat, panaskan dengan penangas air pada temperatur 60 °C sampai dengan 70 °C selama 15 menit, sesekali diaduk dan dinginkan;
- c) tambahkan 3 tetes indikator fenolftalein, 10 mL alkohol 95%, tutup labu ekstraksi, dan aduk selama 15 detik;
- d) untuk ekstraksi pertama, tambahkan 25 mL etil eter, tutup labu ekstraksi, dan kocok dengan kencang selama 1 menit;
- e) longgarkan sesekali tutup labu ekstraksi apabila diperlukan;
- f) tambahkan 25 mL petroleum eter, tutup labu ekstraksi, dan kocok dengan kencang selama 1 menit;
- g) longgarkan sesekali tutup labu ekstraksi apabila diperlukan;
- h) sentrifus labu tersebut pada 600 rpm selama 30 detik sehingga terjadi pemisahan fase air (merah muda terang) dan eter dengan jelas;
- i) tuangkan lapisan eter dengan hati-hati ke dalam labu lemak atau pinggan aluminium kosong yang telah diketahui bobotnya ( $W_0$ );
- j) lapisan air digunakan untuk ekstraksi berikutnya;
- k) untuk ekstraksi kedua ulangi cara kerja A.4.4.c sampai dengan A.4.4.j dengan penambahan 5 mL alkohol 95%, 15 mL etil eter, dan 15 mL petroleum eter;
- l) untuk ekstraksi ketiga ulangi cara kerja A.4.4.c sampai dengan A.4.4.j dengan tanpa penambahan alkohol 95%, 15 mL etil eter, dan 15 mL petroleum eter (ekstraksi ketiga tidak perlu dilakukan pada susu bubuk skim);
- m) uapkan pelarut di atas penangas air dan keringkan labu lemak / pinggan aluminium yang berisi ekstrak lemak tersebut dalam oven pada temperatur  $(100 \pm 1)$  °C selama 30 menit atau oven vakum pada temperatur 70 °C sampai dengan 75 °C dengan tekanan < 50 mmHg (6,7 KPa);
- n) dinginkan dalam desikator dan timbang sampai dengan bobot tetap ( $W_1$ ).

### A.4.4 Perhitungan

$$\text{Kadar lemak susu (\%)} = \frac{W_1 - W_0}{W} \times 100\%$$

#### Keterangan:

- W adalah bobot contoh, dinyatakan dalam gram (g);
- $W_0$  adalah bobot labu lemak/ pinggan aluminium kosong, dinyatakan dalam gram (g);
- $W_1$  adalah bobot labu lemak/ pinggan aluminium kosong dan lemak, dinyatakan dalam gram (g).



#### A.4.5 Ketelitian

Kisaran hasil dua kali ulangan maksimum 10% dari nilai rata-rata hasil lemak atau deviasi (RSD) maksimum 4%. Jika kisaran lebih besar dari 10% atau deviasi lebih besar dari 4%, maka uji harus diulang kembali.

### A.5 Kadar protein (dalam padatan susu tanpa lemak)

#### A.5.1 Total padatan susu

##### A.5.1.1 Prinsip

Contoh uji dididihkan pada penangas dan air yang tersisa dievaporasi pada oven bertemperatur  $102 \pm 2$  °C.

##### A.5.1.2 Peralatan

- a) Desikator yang berisi desikan;
- b) Cawan porselen;
- c) Oven terkalibrasi dengan ketelitian 1 °C; dan
- d) Neraca analitik terkalibrasi dengan ketelitian 0,1 mg.

##### A.5.1.3 Cara kerja

- a) Panaskan cawan porselen beserta tutup di sebelahnya pada oven bertemperatur  $102 \pm 2$  °C selama 1 jam; kemudian tutup cawan porselen dan tempatkan segera ke dalam desikator;
- b) diamkan pada temperatur ruang selama 30 menit kemudian timbang dengan ketelitian 0,1 mg ( $w_0$ );
- c) Hangatkan contoh uji pada temperatur 35 °C sampai dengan 40 °C dengan menggunakan penangas air, aduk secara perlahan, dinginkan contoh dengan segera pada temperatur 20 °C sampai dengan 25 °C;
- d) untuk mengurangi evaporasi air selama pengadukan, wadah pengaduk harus selalu dalam keadaan tertutup.;
- e) timbang 1 sampai dengan 5 g contoh uji yang telah dipreparasi pada cawan porselen ( $w_1$ ), miringkan cawan untuk menyebarkan contoh uji hingga ke dasar cawan;
- f) tempatkan cawan porselen tanpa penutup pada air mendidih di dalam penangas air sedemikian rupa hingga bagian dasar cawan terpapar secara maksimum dan secara langsung dipanaskan oleh uap air, biarkan selama 30 menit;
- g) keluarkan cawan dari penangas air dan masukkan cawan porselen beserta penutup di sebelahnya ke dalam oven temperatur  $102 \pm 2$  °C selama 2 jam, kemudian tutup cawan porselen dan pindahkan segera ke dalam desikator;
- h) dinginkan cawan porselen dan tutupnya pada temperatur ruang setidaknya selama 30 menit dan timbang dengan ketelitian 0,1 mg;
- i) panaskan kembali cawan beserta tutup yang diletakkan di sebelahnya dalam oven temperatur  $102 \pm 2$  °C selama 1 jam, kemudian tutup cawan porselen dan pindahkan segera ke dalam desikator;
- j) dinginkan cawan porselen dan tutupnya pada temperatur ruang setidaknya selama 30 menit dan timbang dengan ketelitian 0,1 mg;
- k) ulangi tahap A.5.4.1.i sampai diperoleh perbedaan bobot tidak lebih dari 1 mg, catat bobot terendah ( $w_2$ ).



#### A.5.1.4 Perhitungan

$$\text{Total padatan (\%)} = \frac{W_2 - W_0}{W_1 - W_0} \times 100$$

##### Keterangan:

$W_0$  adalah cawan kosong dan tutupnya, dinyatakan dalam gram (g);

$W_1$  adalah bobot cawan, tutupnya, dan contoh sebelum dikeringkan, dinyatakan dalam gram (g);

$W_2$  adalah bobot cawan, tutupnya, dan contoh setelah dikeringkan, dinyatakan dalam gram (g).

#### A.5.1.5 Ketelitian

Kisaran hasil dua kali ulangan maksimum 5% dari nilai rata-rata hasil kadar air atau deviasi (RSD) maksimum 2%. Jika kisaran lebih besar dari 5% atau deviasi lebih besar dari 2%, maka uji harus diulang kembali.

### A.5.2. Kadar protein (dalam padatan susu tanpa lemak)

#### A.5.2.1. Prinsip

Contoh didestruksi dengan menggunakan campuran asam sulfat pekat dan kalium sulfat ( $K_2SO_4$ ), menggunakan katalis copper (II) sulfat untuk melepaskan nitrogen dari protein sebagai garam amonium. Garam amonium tersebut diuraikan menjadi  $NH_3$  pada saat destilasi menggunakan NaOH.  $NH_3$  yang dibebaskan dan diikat dengan asam borat menghasilkan ammonium borat yang secara kuantitatif dititrasi dengan larutan baku asam sehingga diperoleh total nitrogen. Kadar protein diperoleh dari hasil kali total nitrogen dengan 6,38 dan dihitung dalam padatan susu tanpa lemak.

#### A.5.2.2. Peralatan

- Alat destilasi *Kjeldahl* konvensional atau otomatis;
- Alat destruksi (blok digesti);
- Neraca analitik terkalibrasi dengan ketelitian 0,1 mg;
- Penangas air;
- Buret 10 mL terkalibrasi;
- Labu ukur 500 mL, 100 mL, dan 50 mL;
- Erlenmeyer 500 mL; dan
- pH meter.

#### A.5.2.3. Pereaksi

- Kalium sulfat ( $K_2SO_4$ ) bebas nitrogen;
- Larutan copper (II) sulfat ( $CuSO_4$ ), 5,0 g per 100 mL;  
Larutkan 5,0 g copper (II) sulfat perhidrat ( $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ ) dalam air pada labu ukur 100 mL.
- Asam sulfat ( $H_2SO_4$ ) dengan fraksi massa sedikitnya 95% hingga 98%, bebas nitrogen;
- Larutan natrium hidroksida (NaOH), bebas nitrogen, mengandung 50 g NaOH per 100 g larutan;
- Larutan indikator *methyl red* (MR)/ *bromocresol green* (BCG);  
larutkan 0,2 g *methyl red* dengan etanol 95% menjadi 100 mL. Larutkan 1,0 g *bromocresol green* dengan etanol 95% menjadi 500 mL. Campurkan 1 bagian larutan *methyl red* dan 5 bagian larutan *bromocresol green* dalam gelas piala lalu pindahkan ke dalam botol bertutup gelas.
- Larutan asam borat ( $H_3BO_3$ ) 4%;



Timbang 4 g  $\text{H}_3\text{BO}_3$ , larutkan ke dalam air yang mengandung 0,7 mL larutan indikator *methyl red* 1% *bromocresol green* 1%, encerkan hingga 100 mL, aduk, (larutan akan berwarna kuning terang) dan pindahkan ke dalam botol bertutup gelas.

- g) Larutan standar asam hidroklorida ( $\text{HCl}$ )  $0,1 \pm 0,005$  mol/L;
- h) Ammonium sulfat  $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$  minimum 99,9% (fraksi massa) pada bahan kering; Sesaat sebelum digunakan, keringkan  $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$  pada temperatur  $102^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$  selama tidak kurang dari 2 jam. Dinginkan pada temperatur ruang di dalam desikator.
- i) Triptofan ( $\text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_2$ ) atau lysin hidroklorida ( $\text{C}_6\text{H}_{15}\text{ClN}_2\text{O}_2$ ); Jangan mengeringkan pereaksi ini dalam oven sebelum digunakan.
- j) Sukrosa, dengan kandungan nitrogen tidak lebih dari 0,002% (fraksi massa); dan
- k) Batu didih.

#### A.5.2.4. Cara kerja

##### A.5.2.4.1. Preparasi contoh uji

- a) Tambahkan ke dalam tabung digesti 12,0 g  $\text{K}_2\text{SO}_4$ , 1,0 mL larutan  $\text{CuSO}_4$ , 1 sampai dengan 2 g contoh (W) dan 20 mL  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ;
- b) gunakan  $\text{H}_2\text{SO}_4$  untuk membilas larutan  $\text{CuSO}_4$ ,  $\text{K}_2\text{SO}_4$  atau contoh uji yang tertinggal di permukaan tabung digesti.

##### A.5.2.4.2. Penetapan

###### A.5.2.4.2.1 Digesti

- a) Atur blok digesti pada temperatur awal rendah untuk mengendalikan busa (antara temperatur  $180^\circ\text{C}$  dan  $230^\circ\text{C}$ ), pindahkan tabung digesti ke dalam alat destruksi, digestikan contoh uji selama 30 menit hingga terbentuk asap, kemudian naikan temperatur blok digesti hingga bertemperatur  $410^\circ\text{C}$  sampai dengan  $430^\circ\text{C}$ , lanjutkan proses digesti sampai larutan menjadi jernih. Lakukan dalam lemari asap atau lengkapi alat pengisapan asap;
- b) setelah larutan berwarna jernih kehijau-hijauan, lanjutkan proses digesti pada temperatur  $410^\circ\text{C}$  sampai dengan  $430^\circ\text{C}$  selama 1 jam, pada saat itu  $\text{H}_2\text{SO}_4$  akan mendidih. Bila didihan dari larutan jernih tidak terlihat menandakan temperatur dari blok digesti terlalu rendah, bila demikian proses digesti dilakukan selama 1,75 sampai dengan 2,5 jam;
- c) untuk menetapkan waktu pendidihan spesifik yang dibutuhkan untuk kondisi analisis menggunakan alat yang ada, gunakan contoh uji susu yang berprotein tinggi dan berlemak tinggi dan tetapkan kadar proteinnya dengan meningkatkan waktu pendidihan (1 jam sampai dengan 1,5 jam) setelah terbentuk cairan berwarna jernih kehijau-hijauan. Rata-rata hasil protein akan meningkat dengan meningkatnya waktu didih, menjadi konsisten, dan kemudian akan menurun bila waktu didih terlalu lama;
- d) pada akhir tahap digesti, larutan harus jernih dan bebas dari bahan-bahan tak terdestruksi. Keluarkan tabung digesti dari blok digesti;
- e) diamkan hasil digesti menjadi dingin pada temperatur ruang selama 25 menit. Hasil digesti yang telah dingin berbentuk cair atau cair dengan sedikit endapan kristal di bagian bawah tabung. Jangan biarkan hasil digesti tak larut berada dalam tabung semalaman karena akan terus mengkristal selama waktu tersebut dan akan sangat sulit mendestruksi kembali kristal tersebut menjadi larutan.

**CATATAN** kristalisasi berlebihan setelah 25 menit dapat menyebabkan kehilangan asam yang tidak diinginkan dan dapat menyebabkan hasil uji yang rendah. Kehilangan asam yang tidak diinginkan juga dapat disebabkan pengeluaran asap yang berlebihan atau proses digesti yang terlalu lama akibat temperatur digesti yang terlalu rendah. Untuk mereduksi laju penurunan asam, turunkan laju pengeluaran asap.



#### A.5.2.4.2.2 Destilasi

- Nyalakan kondensor air pada alat destilasi. Pasang tabung digesti yang mengandung larutan hasil digesti pada unit destilasi, tempatkan erlenmeyer yang berisi 50 mL larutan asam borat di bagian bawah kondensor tepat di bawah bagian *outlet*. Atur unit destilasi untuk mengeluarkan 55 mL larutan NaOH;
- jika larutan NaOH telah digunakan 40%, maka volume NaOH yang dikeluarkan diatur menjadi 65 mL;
- operasikan unit destilasi sedemikian rupa untuk mendestilasi uap kan amonia yang dibebaskan melalui penambahan larutan NaOH, kumpulkan destilat yang terdapat pada larutan asam borat;
- lanjutkan proses destilasi hingga diperoleh sedikitnya 150 mL destilat. Pindahkan erlenmeyer dari unit destilasi, kuras tip destilasi, bilas bagian luar dan dalam tip dengan air, tampung air bilasan pada erlenmeyer. Tip harus selalu dibilas pada tiap analisis contoh uji yang berbeda. Efisiensi kondensor harus dapat menghasilkan temperatur larutan dalam erlenmeyer tidak lebih dari 35 °C selama proses destilasi.

#### A.5.2.4.2.3 Titrasi

- Titar larutan campuran destilat pada erlenmeyer dengan HCl dengan menggunakan buret. Titik akhir titrasi diperoleh pada saat terjadi perubahan warna titer menjadi merah muda. Estimasi pembacaan buret dengan ketelitian 0,05 mL. Bantuan pengaduk magnetik dapat membantu dalam penampakan titik akhir titrasi;
- alternatif proses, titar larutan campuran destilat pada erlenmeyer dengan HCl menggunakan alat titrasi otomatis yang dilengkapi dengan pH meter. Titik akhir titrasi diperoleh pada saat pH mencapai 4,6 yang menjadi titik tercuram pada kurva titrasi. Hitung jumlah titran yang digunakan.

#### A.5.2.4.2.4 Uji blanko

- Titar blanko dengan HCl dengan menggunakan buret atau alat titrasi otomatis yang dilengkapi dengan pH meter sebagaimana yang digunakan pada contoh uji;
- uji blanko menggunakan prosedur A.5.4.1 sampai dengan A.5.4.2.3 dengan mengganti contoh uji dengan 5 mL air dan sekitar 0,85 g sukrosa;
- catat nilai blanko, bila nilai blanko berubah segera identifikasi penyebabnya. Jumlah titran yang digunakan pada uji blanko harus lebih besar daripada nol. Nilai blanko biasanya sama dengan atau lebih rendah dari 0,2 mL.

#### A.5.2.5 Perhitungan

$$\text{Kadar protein (\%)} = \frac{(V_1 - V_2) \times N \times 14,007 \times 6,38 \times 100\%}{W} \times \frac{100}{\text{total padatan susu} - \text{total lemak}}$$

##### Keterangan:

- $V_1$  adalah volume HCl 0,1 N untuk titrasi contoh, dinyatakan dalam mililiter (mL);  
 $V_2$  adalah volume HCl 0,1 N untuk titrasi blanko, dinyatakan dalam mililiter (mL);  
 $N$  adalah normalitas larutan HCl, dinyatakan dalam Normalitas (N);  
 $W$  adalah bobot contoh, dinyatakan dalam miligram (mg);  
 14,007 adalah bobot atom Nitrogen;  
 6,38 adalah faktor konversi protein untuk susu.



**A.5.2.6 Ketelitian**

Kisaran hasil dua kali ulangan maksimum 5% dari nilai rata-rata hasil kadar protein atau deviasi (RSD) maksimum 3%. Jika kisaran lebih besar dari 5% atau deviasi lebih dari 3%, maka uji harus diulang kembali.

**A.6 Scorched particles****A.6.1. Prinsip**

Contoh uji dilarutkan dengan akuades pada temperatur  $60 \pm 1$  °C. Larutan yang diperoleh disaring dengan kertas saring kemudian dikeringkan. Kertas saring (*disc*) kering yang mengandung *scorched particles* secara visual dibandingkan dengan kertas saring (*disc*) standar.

**A.6.2. Peralatan**

- a) Neraca analitik terkalibrasi dengan ketelitian 0,1 mg;
- b) Pengaduk / *blender*;
- c) Kertas saring diameter 32 mm dengan ukuran poril 5µm sampai dengan 10 µm;
- d) Penangas air;
- e) Alat penyaring yang dilengkapi dengan aspirator dengan diameter 28,5 mm;
- f) Pengaduk; dan
- g) *Scorched particles standard disc*.

**A.6.3. Pelarut**

- a) Akuades; dan
- b) Oktanol atau diglycol laurat L sebagai anti buih.

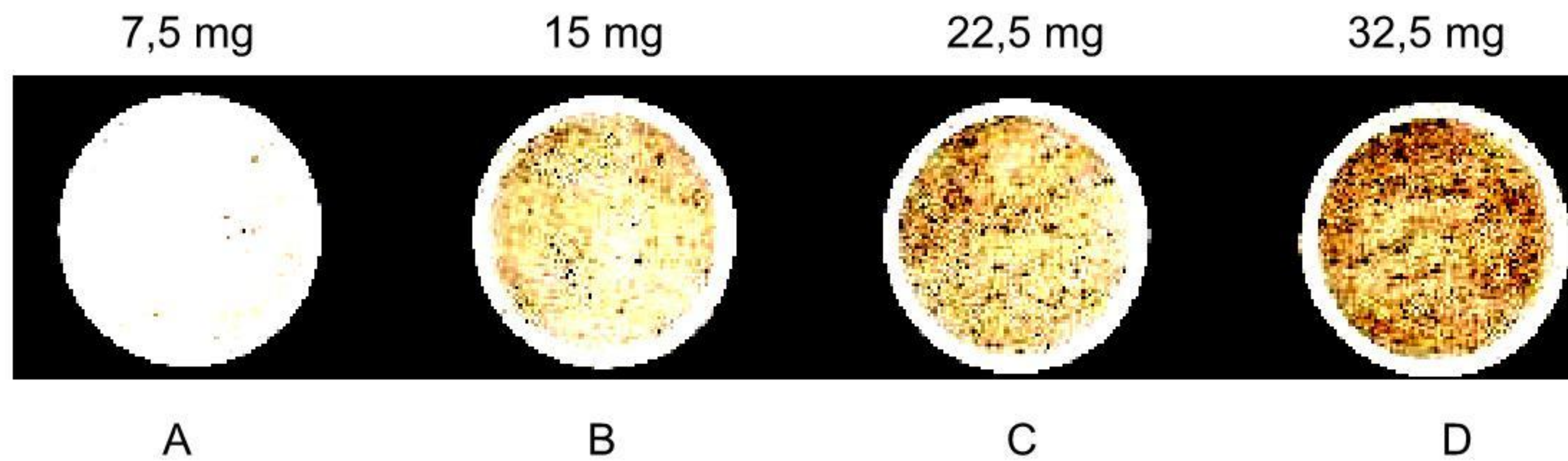
**A.6.4. Cara kerja**

- a) Timbang contoh dengan ketelitian 0,1 mg sebesar 32,5 g untuk susu *full cream*, dan 25,0 g untuk susu skim dan skim sebagian;
- b) tuangkan contoh pada gelas pengaduk (*blender*) kemudian tambahkan 250 mL akuades bertemperatur  $60 \pm 1$  °C;
- c) tambahkan 2 sampai dengan 3 tetes bahan anti buih;
- d) aduk selama 60 detik;
- e) saring larutan contoh dengan menggunakan vakum, kemudian bilas permukaan kaca pada *blender* dengan 50 mL akuades kemudian saring dengan penyaring yang sama;
- f) biarkan kertas saring mengering selama 2 jam pada temperatur 35 °C.

**A.6.5. Evaluasi dan pernyataan hasil**

- a) Bandingkan kertas saring yang diuji dengan kertas saring standar *scorched particles* seperti pada Gambar A.1





**Gambar A.1 – Kertas saring standar *scorched particles***

- b) tetapkan kertas saring yang diuji di antara dua kertas saring standar untuk mengklasifikasikan *scorched particles* yang terdapat pada kertas saring hasil uji;
- c) tetapkan kadar *scorched particles* pada lembar klasifikasi sesuai dengan standar kertas saring A, B, C, dan D.

## **A.7 Indeks ketidak larutan**

### **A.7.1 Prinsip**

Volume endapan (residu tak larut) diperoleh pada saat susu bubuk direkonstitusi dan susu rekonstitusi disentrifugasi pada kondisi tertentu. Air bertemperatur 24 °C (untuk susu yang dikeringkan dengan *spray dryer*) atau bertemperatur 50 °C (untuk susu yang dikeringkan dengan *rolling-dryer*) ditambahkan pada contoh uji, kemudian diaduk. Setelah beberapa saat, susu rekonstitusi tersebut disentrifugasi. Cairan supernatan dibuang dan endapan disebarkan dengan penambahan air yang bertemperatur sama dengan yang digunakan pada saat rekonstitusi. Campuran tersebut disentrifugasi kembali dan volume endapan (residu tak larut) yang diperoleh dihitung.

### **A.7.2 Peralatan**

- a) Termometer,
- b) Penangas air, dapat mempertahankan temperatur  $24,0 \pm 0,2$  °C dan/atau  $50,0 \pm 0,2$  °C yang dapat digunakan sebagai tempat meletakkan wadah contoh;
- c) *Mixing jar* terbuat dari kaca dengan kapasitas 500 mL;
- d) Sendok;
- e) Neraca analitik terkalibrasi dengan ketelitian 0,1 mg;
- f) Gelas ukur berukuran  $100 \text{ mL} \pm 0,5 \text{ mL}$ ;
- g) Sikat;
- h) *Mixer*;
- i) *Interval timer*;
- j) Sendok spatula;
- k) Tabung sentrifus;
- l) Sentrifus;
- m) Tabung penghisap yang menempel pada pompa air;
- n) Batang pengaduk; dan
- o) Kaca pembesar.

### **A.7.3 Pereaksi**

- a) *Silicone antifoaming agent*; dan
- b) Akuades.



## A.7.4 Cara kerja

### A.7.4.1 Preparasi contoh uji

- Sebelum memulai proses penetapan, pastikan bahwa contoh pada laboratorium telah dijaga temperaturnya ( $20\text{ }^{\circ}\text{C}$  sampai dengan  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) selama 48 jam sehingga hal-hal yang mempengaruhi ketidak larutan yang disebabkan oleh keadaan fisik dari lemak bersifat konstan antar contoh uji;
- aduk contoh pada laboratorium dengan memutar dan membolak-balikkan wadah;
- jika wadah terlalu penuh untuk dilakukan pencampuran, pindahkan semua contoh ke wadah yang bersih, kering, tertutup rapat, dan mempunyai kapasitas yang memadai.

### A.7.4.2 Preparasi *Mixing jar*

- Atur temperatur *mixing jar* pada temperatur  $24\text{ }^{\circ}\text{C}$  atau pada temperatur  $50\text{ }^{\circ}\text{C}$  dengan meletakkan *mixing jar* pada penangas air dengan ketinggian air mendekati bagian atas *jar* selama beberapa waktu.

## A.7.5 Penetapan

- Timbang contoh uji dengan ketelitian  $0,01\text{ g}$  dengan menggunakan sendok atau pada kertas *sampling* dengan jumlah sebagai berikut:
  - $13,00\text{ g}$  untuk susu bubuk *full cream* dan susu bubuk skim sebagian;
  - $10,00\text{ g}$  untuk susu bubuk skim; atau
  - $7,00\text{ g}$  untuk *whey* kering.
- keluarkan *jar* dari penangas air, segera keringkan bagian luar *jar*, dan dengan menggunakan gelas ukur, tambahkan  $100\text{ mL} \pm 0,5\text{ mL}$  air bertemperatur  $24,0\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,2\text{ }^{\circ}\text{C}$  atau  $50,0\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,2\text{ }^{\circ}\text{C}$  sesuai dengan jenis contoh uji;
- tambahkan 3 tetes *silicone anti foaming agent* pada air di dalam *mixing jar* dan masukkan contoh uji ke dalam *jar* dengan menggunakan sikat, jika perlu, sehingga seluruh contoh uji jatuh ke permukaan air;
- tempatkan *mixing jar* pada *mixer*, nyalakan *mixer* selama 90 detik kemudian matikan;
- lepaskan *mixing jar* dari *mixer*, biarkan *jar* beberapa saat untuk membiarkan cairan yang terdapat pada putaran *mixer* masuk ke dalam *jar* yaitu selama tidak kurang dari 5 menit dan tidak lebih dari 15 menit;
- tambahkan 3 tetes *silicone anti foaming agent* pada campuran di dalam *mixing jar*, campurkan dengan pengadukan selama 10 detik dengan spatula;
- segera tuang campuran ke dalam tabung sentrifus hingga  $50\text{ mL}$ , tempatkan tabung sentrifus pada alat sentrifus yang diatur temperaturnya  $20\text{ }^{\circ}\text{C}$  sampai dengan  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ , sentrifugasi pada frekuensi rotasi yang dapat menghasilkan akselerasi  $160\text{ g}_n$  pada bagian bawah tabung, kemudian putar pada frekuensi putaran ini selama 5 menit;
- buka tutup tabung sentrifus dan gunakan spatula untuk membuang supernatan dalam tabung;
- tambahkan akuades pada temperatur  $24\text{ }^{\circ}\text{C}$  sampai dengan  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$  pada tabung sentrifus sampai bagian atas memenuhi tanda  $30\text{ mL}$  pada tabung. Campurkan endapan yang terdapat pada tabung dengan batang pengaduk, ketuk-ketukkan bagian bawah tabung untuk melepaskan bagian yang menempel pada tabung, kemudian tambahkan kembali akuades sampai dengan tanda  $50\text{ mL}$  pada tabung;
- tutup tabung sentrifus dengan sumbat karet. Bolak-balikkan tabung secara cepat sebanyak lima kali, buka sumbat karet, kemudian sentrifugasi selama 5 menit sesuai dengan kecepatan pada A.9.4.3.g;
- keluarkan tabung sentrifus, tahan tabung dalam posisi vertikal dengan posisi endapan sejajar dengan mata, kemudian gunakan kaca pembesar untuk melihat volume endapan dengan ketelitian  $0,05\text{ mL}$  jika volume endapan kurang dari  $0,5\text{ mL}$  dan ketelitian  $0,1\text{ mL}$  jika volume endapan lebih dari  $0,5\text{ mL}$ .



### A.7.6 Pernyataan hasil

Indeks ketidak larutan digambarkan sebagai volume endapan yang terdapat pada tabung sentrifus. Nyatakan hasil dengan menyertakan temperatur air yang digunakan untuk merekonstitusi susu bubuk, seperti contoh berikut:

- 0,10 mL (24 °C)
- 4,1 mL (50 °C)

## A.8 Cemarkan logam

### A.8.1 Timbal (Pb) dan kadmium (Cd)

#### A.8.3.1 Prinsip

Destruksi contoh dengan cara pengabuan kering pada 450 °C yang dilanjutkan dengan pelarutan dalam larutan asam. Logam yang terlarut dihitung menggunakan alat Spektrofotometer Serapan Atom (SSA) dengan panjang gelombang maksimum 228,8 nm untuk Cd dan 283,3 nm untuk Pb.

#### A.8.3.2 Peralatan

- a) SSA beserta kelengkapannya (lampu katoda Cd dan Pb) terkalibrasi (sebaiknya menggunakan SSA tungku grafit);
- b) Tanur terkalibrasi dengan ketelitian 1 °C;
- c) Neraca analitik terkalibrasi dengan ketelitian 0,1 mg;
- d) Pemanas listrik;
- e) Penangas air;
- f) Pipet ukur berskala 0,05 mL atau mikro buret terkalibrasi;
- g) Labu ukur 1 000 mL, 100 mL, dan 50 mL, terkalibrasi;
- h) Gelas ukur 10 mL;
- i) Gelas piala 250 mL;
- j) Botol polipropilen;
- k) Cawan porselen/platina/kwarsa 50 mL sampai dengan 100 mL; dan
- l) Kertas saring tidak berabu dengan *particle retention* 20 µm sampai dengan 25 µm.

#### A.8.3.3 Pereaksi

- a) Asam nitrat, HNO<sub>3</sub> pekat;
- b) Asam klorida, HCl pekat;
- c) Larutan asam nitrat, HNO<sub>3</sub> 0,1 N;  
encerkan 7 mL HNO<sub>3</sub> pekat dengan aquabides dalam labu ukur 1 000 mL sampai tanda garis.
- d) Larutan asam klorida, HCl 6 N;  
encerkan 500 ml HCl pekat dengan aquabides dalam labu ukur 1 000 mL sampai tanda garis.
- e) Larutan baku 1 000 µg/mL Cd;  
larutkan 1,000 g Cd dengan 7 mL HNO<sub>3</sub> pekat dalam gelas piala 250 mL dan masukkan ke dalam labu ukur 1 000 mL kemudian encerkan dengan akuabides sampai tanda garis. Alternatif lain, bisa digunakan larutan baku Cd 1 000 µg/mL siap pakai.
- f) Larutan baku 200 µg/mL Cd;  
pipet 10 mL larutan baku 1 000 µg/mL Cd ke dalam labu ukur 50 mL kemudian encerkan dengan akuabides sampai tanda garis kemudian dikocok. Larutan baku kedua ini memiliki konsentrasi 200 µg/mL Cd.



- g) Larutan baku 20 µg/mL Cd;  
pipet 10 mL larutan baku 200 µg/mL Cd ke dalam labu ukur 100 mL kemudian encerkan dengan akuabides sampai tanda garis kemudian dikocok. Larutan baku ketiga ini memiliki konsentrasi 20 µg/mL Cd.
- h) Larutan baku kerja Cd;  
pipet ke dalam labu ukur 100 mL masing-masing sebanyak 0 mL, 0,5 mL, 1 mL; 2 mL; 4 mL; 7 mL dan 9 mL larutan baku 20 µg/mL kemudian tambahkan 5 mL larutan HNO<sub>3</sub> 1 N atau HCl 6 N, dan encerkan dengan akuabides sampai tanda garis kemudian kocok. Larutan baku kerja ini memiliki konsentrasi 0 µg/mL; 0,1 µg/mL; 0,2 µg/mL; 0,4 µg/mL; 0,8 µg/mL; 1,4 µg/mL dan 1,8 µg/mL Cd.
- i) Larutan baku 1 000 µg/mL Pb;  
larutkan 1,000 g Pb dengan 7 mL HNO<sub>3</sub> pekat dalam gelas piala 250 mL dan masukkan ke dalam labu ukur 1 000 mL kemudian encerkan dengan akuabides sampai tanda garis. Alternatif lain, bisa digunakan larutan baku Pb 1 000 µg/mL siap pakai.
- j) Larutan baku 50 µg/mL Pb; dan  
pipet 5,0 mL larutan baku 1 000 µg/mL Pb ke dalam labu ukur 100 mL dan encerkan dengan akuabides sampai tanda garis kemudian kocok. Larutan baku kedua ini memiliki konsentrasi Pb 50 µg/mL.
- k) Larutan baku kerja Pb.  
pipet ke dalam labu ukur 100 mL masing-masing sebanyak 0 mL, 0,2 mL; 0,5 mL; 1 mL; 2 mL; 3 mL dan 4 mL larutan baku 50 µg/mL kemudian tambahkan 5 mL larutan HNO<sub>3</sub> 1 N atau HCl 6 N, dan encerkan dengan akuabides sampai tanda garis kemudian kocok. Larutan baku kerja ini memiliki konsentrasi 0 µg/mL; 0,1 µg/mL; 0,25 µg/mL; 0,5 µg/mL; 1,0 µg/mL; 1,5 µg/mL dan 2,0 µg/mL Pb.

#### A.8.3.4 Cara kerja

- a) Timbang 10 g sampai dengan 20 g contoh (m) dengan teliti dalam cawan porselen/platina/kuarsa;
- b) tempatkan cawan berisi contoh di atas pemanas listrik dan panaskan secara bertahap sampai contoh tidak berasap lagi;
- c) lanjutkan pengabuan dalam tanur (450 ± 5) °C sampai abu berwarna putih, bebas dari karbon;
- d) apabila abu belum bebas dari karbon yang ditandai dengan warna keabu-abuan, basahkan dengan beberapa tetes air dan tambahkan tetes demi tetes HNO<sub>3</sub> pekat kira-kira 0,5 sampai dengan 3 mL;
- e) keringkan cawan di atas pemanas listrik dan masukkan kembali ke dalam tanur pada temperatur (450 ± 5) °C kemudian lanjutkan pemanasan sampai abu menjadi putih. Penambahan HNO<sub>3</sub> pekat dapat diulangi apabila abu masih berwarna keabu-abuan;
- f) larutkan abu berwarna putih dalam 5 mL HCl 6 N, sambil dipanaskan di atas pemanas listrik atau penangas air sampai kering, kemudian larutkan dengan HNO<sub>3</sub> 0,1 N sebanyak 10 mL dan masukkan ke dalam labu ukur 50 mL kemudian tepatkan hingga tanda garis dengan air suling (V), jika perlu, saring larutan menggunakan kertas saring, ke dalam botol polipropilen;
- g) siapkan larutan blanko dengan penambahan pereaksi dan perlakuan yang sama seperti contoh;
- h) baca absorbans larutan baku kerja dan larutan contoh terhadap blanko menggunakan SSA pada panjang gelombang maksimum sekitar 228,8 nm untuk Cd dan 283 nm untuk Pb;
- i) buat kurva kalibrasi antara konsentrasi logam (µg/mL) sebagai sumbu X dan absorbans sebagai sumbu Y;
- j) plot hasil pembacaan larutan contoh terhadap kurva kalibrasi (C); dan
- k) hitung kandungan logam dalam contoh.



### A.8.3.5 Perhitungan

$$\text{Kandungan logam (mg/kg)} = \frac{C}{m} \times V$$

#### Keterangan:

C adalah konsentrasi logam dari kurva kalibrasi, dinyatakan dalam mikrogram per mililiter ( $\mu\text{g/mL}$ );

V adalah volume larutan akhir, dinyatakan dalam mililiter (ml);

m adalah bobot contoh, dinyatakan dalam gram (g).

### A.8.3.6 Ketelitian

Kisaran hasil dua kali ulangan RSD (*relative standard deviation*) maksimum 16%. Jika RSD lebih besar dari 16%, maka analisis harus diulang kembali.

## A.8.2 Timah (Sn)

### A.8.3.1 Prinsip

Contoh didestruksi dengan  $\text{HNO}_3$  dan  $\text{HCl}$  kemudian tambahkan  $\text{KCl}$  untuk mengurangi gangguan. Sn dibaca menggunakan SSA pada panjang gelombang maksimum 235,5 nm dengan nyala oksidasi  $\text{N}_2\text{O}-\text{C}_2\text{H}_2$ .

### A.8.3.2 Peralatan

- SSA beserta kelengkapannya (lampu katoda Sn) terkalibrasi;
- Tanur terkalibrasi dengan ketelitian  $1^\circ\text{C}$ ;
- Neraca analitik terkalibrasi dengan ketelitian 0,1 mg;
- Pemanas listrik;
- Penangas air;
- Labu ukur 1 000 mL, 100 mL, dan 50 mL, terkalibrasi;
- Pipet ukur 10 mL dan 5 mL, berskala 0,1 mL, terkalibrasi;
- Erlenmeyer 250 mL;
- Gelas ukur 50 mL; dan
- Gelas piala 250 mL.

### A.8.3.3 Pereaksi

- Larutan kalium klorida ( $\text{KCl}$ ) 10 mg/mL;  
larutkan 1,91 g  $\text{KCl}$  dengan air suling menjadi 100 mL.
- Asam nitrat ( $\text{HNO}_3$ ) pekat;
- Asam klorida ( $\text{HCl}$ ) pekat;
- Larutan baku 1 000  $\mu\text{g/mL}$  Sn; dan  
larutkan 1,000 g Sn dengan 200 mL  $\text{HCl}$  pekat dalam labu ukur 1 000 mL, tambahkan 200 mL air suling, dinginkan pada temperatur ruang dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis.
- Larutan baku kerja Sn.  
pipet 10 mL  $\text{HCl}$  pekat dan 1,0 mL larutan  $\text{KCl}$  ke dalam masing-masing labu ukur 100 mL. Tambahkan masing-masing 0 mL; 0,5 mL; 1,0 mL; 1,5 mL; 2,0 mL dan 2,5 mL larutan baku 1 000  $\mu\text{g/mL}$  Sn dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis. Larutan baku kerja ini memiliki konsentrasi 0  $\mu\text{g/mL}$ ; 5  $\mu\text{g/mL}$ ; 10  $\mu\text{g/mL}$ ; 15  $\mu\text{g/mL}$ ; 20  $\mu\text{g/mL}$  dan 25  $\mu\text{g/mL}$  Sn.



#### A.8.3.4 Cara kerja

- Timbang 5 g sampai dengan 10 g contoh (W) dengan teliti ke dalam Erlenmeyer 250 mL, keringkan dalam oven 120 °C, tambahkan 30 mL HNO<sub>3</sub> pekat dan biarkan 15 menit (jangan tambahkan HNO<sub>3</sub> ke dalam contoh jika tahapan destruksi tidak dapat diselesaikan dalam hari yang sama);
- panaskan perlahan selama 15 menit di dalam lemari asam, hindari terjadinya percikan yang berlebihan;
- lanjutkan pemanasan sehingga sisa volume 3 mL sampai dengan 6 mL atau sampai contoh mulai kering pada bagian bawahnya, hindari terbentuknya arang;
- angkat Erlenmeyer dari pemanas listrik, tambahkan 25 mL HCl pekat, dan panaskan selama 15 menit sampai letupan dari uap Cl<sub>2</sub> berhenti;
- tingkatkan pemanasan dan didihkan sehingga sisa volume 10 mL sampai dengan 15 mL;
- tambahkan 40 mL air suling, aduk, dan tuangkan ke dalam labu ukur 100 mL, bilas Erlenmeyer tersebut dengan 10 mL aquabides (V);
- tambahkan 1,0 mL KCl, dinginkan pada temperatur ruang, tepatkan dengan air suling sampai tanda garis dan saring;
- siapkan larutan blanko dengan penambahan pereaksi dan perlakuan yang sama seperti contoh;
- baca absorbansi larutan baku kerja dan larutan contoh terhadap blanko menggunakan SSA pada panjang gelombang maksimum 235,5 nm dengan nyala oksidasi N<sub>2</sub>O-C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>;
- buat kurva kalibrasi antara konsentrasi logam (µg/mL) sebagai sumbu X dan absorbansi sebagai sumbu Y;
- plot hasil pembacaan larutan contoh terhadap kurva kalibrasi (C);
- lakukan pengerjaan duplo; dan
- hitung kandungan Sn dalam contoh.

#### A.8.3.5 Perhitungan

$$\text{Kandungan timah (Sn) (mg/kg)} = \frac{C}{W} \times V$$

##### Keterangan:

- C adalah konsentrasi timah (Sn) dari kurva kalibrasi, dinyatakan dalam mikrogram per mililiter (µg/mL)  
 V adalah volume larutan akhir, dinyatakan dalam mililiter (ml); dan  
 W adalah bobot contoh, dinyatakan dalam gram (g).

#### A.8.3.6 Ketelitian

Kisaran hasil dua kali ulangan RSD (*relative standard deviation*) maksimum 16%. Jika RSD lebih besar dari 16%, maka analisis harus diulang kembali.

### A.8.3 Merkuri (Hg)

#### A.8.3.1 Prinsip

Reaksi antara senyawa merkuri dengan NaBH<sub>4</sub> atau SnCl<sub>2</sub> dalam keadaan asam akan membentuk gas atomik Hg. Jumlah Hg yang terbentuk sebanding dengan absorbansi Hg yang dibaca menggunakan SSA tanpa nyala pada panjang gelombang maksimum 253,7 nm.



### A.8.3.2 Peralatan

- SSA yang dilengkapi lampu katoda Hg dan generator uap hidrida (HVG) terkalibrasi;
- Microwave digester*;
- Neraca analitik terkalibrasi dengan ketelitian 0,1 mg;
- Pemanas listrik;
- Pendingin terbuat dari borosilikat, diameter 12 mm sampai dengan 18 mm, tinggi 400 mm diisi dengan cincin *Raschig* setinggi 100 mm, dan dilapisi dengan batu didih berdiameter 4 mm di atas cincin setinggi 20 mm;
- Tabung destruksi;
- Labu destruksi 250 mL berdasar bulat;
- Labu ukur 1000 mL, 500 mL, 100 mL, dan 50 mL terkalibrasi;
- Gelas ukur 25 mL;
- Pipet ukur berskala 0,05 mL atau mikro buret terkalibrasi; dan
- Gelas piala 500 mL.

### A.8.3.3 Pereaksi

- Larutan asam sulfat ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) 9 M;
- Larutan asam nitrat ( $\text{HNO}_3$ ) 7 M;
- Campuran asam nitrat: asam perklorat ( $\text{HNO}_3 : \text{HClO}_4$ ) 1:1;
- Hidrogen peroksida ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) pekat;
- Larutan natrium molibdat ( $\text{NaMoO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) 2%;
- Larutan pereduksi;  
campurkan 50 mL  $\text{H}_2\text{SO}_4$  dengan 300 mL akuades dalam gelas piala 500 mL dan dinginkan sampai temperatur ruang kemudian tambahkan 15 g NaCl, 15 g hidroksilamin sulfat, dan 25 g  $\text{SnCl}_2$ . Pindahkan ke dalam labu ukur 500 mL dan encerkan dengan akuades sampai tanda garis.
- Larutan natrium borohidrida ( $\text{NaBH}_4$ );  
larutkan 3 g serbuk  $\text{NaBH}_4$  dan 3 g NaOH dengan akuades dalam labu ukur 500 mL.
- Larutan pengencer;  
masukkan 300 mL sampai dengan 500 mL akuades ke dalam labu ukur 1000 mL dan tambahkan 58 mL  $\text{HNO}_3$  kemudian tambahkan 67 mL  $\text{H}_2\text{SO}_4$ . Encerkan dengan akuades sampai tanda garis dan kocok.
- Larutan baku 1000  $\mu\text{g/mL}$  Hg;  
larutkan 0,1354 g  $\text{HgCl}_2$  dengan kira-kira 25 mL akuades dalam gelas piala 250 mL dan masukkan ke dalam labu ukur 100 mL kemudian encerkan dengan akuades sampai tanda garis.
- Larutan baku 1  $\mu\text{g/mL}$  Hg;  
pipet 1 mL larutan baku 1000  $\mu\text{g/mL}$  Hg ke dalam labu ukur 1000 mL dan encerkan dengan larutan pengencer sampai tanda garis, kemudian kocok. Larutan baku kedua ini memiliki konsentrasi 1  $\mu\text{g/mL}$ .
- Larutan baku kerja Hg; dan  
pipet masing-masing 0,25 mL; 0,5 mL; 1 mL; dan 2 mL larutan baku 1  $\mu\text{g/mL}$  ke dalam labu ukur 100 mL terpisah dan encerkan dengan larutan pengencer sampai tanda garis. Larutan baku kerja ini memiliki konsentrasi 0,0025  $\mu\text{g/mL}$ ; 0,005  $\mu\text{g/mL}$ ; 0,01  $\mu\text{g/mL}$ ; 0,02  $\mu\text{g/mL}$  Hg.
- Batu didih.



#### A.8.3.4 Cara kerja

##### A.8.3.4.1 Pengabuan basah

- Timbang 5 g contoh (W) dengan teliti ke dalam labu destruksi dan tambahkan 25 mL  $\text{H}_2\text{SO}_4$  9 M, 20 mL  $\text{HNO}_3$  7 M, 1 mL larutan natrium molibdat 2%, dan 5 butir sampai dengan 6 butir batu didih;
- hubungkan labu destruksi dengan pendingin dan panaskan di atas pemanas listrik selama 1 jam. Hentikan pemanasan dan biarkan selama 15 menit;
- tambahkan 20 mL campuran asam nitrat: asam perklorat ( $\text{HNO}_3$  :  $\text{HClO}_4$ ) 1:1 melalui pendingin;
- hentikan aliran air pada pendingin dan panaskan dengan panas tinggi hingga timbul uap putih. Lanjutkan pemanasan selama 10 menit dan dinginkan;
- tambahkan 10 mL akuades melalui pendingin dengan hati-hati sambil labu digoyang-goyangkan;
- didihkan lagi selama 10 menit;
- matikan pemanas listrik dan cuci pendingin dengan 15 mL akuades sebanyak 3 kali kemudian dinginkan sampai temperatur ruang;
- pindahkan larutan destruksi contoh ke dalam labu ukur 100 mL secara kuantitatif dan encerkan dengan akuades sampai tanda garis (V);
- pipet 25 mL larutan di atas ke dalam labu ukur 100 mL dan encerkan dengan larutan pengencer sampai tanda garis;
- siapkan larutan blanko dengan penambahan pereaksi dan perlakuan yang sama seperti contoh;
- tambahkan larutan pereduksi ke dalam larutan baku kerja Hg, larutan contoh, dan larutan blanko pada alat HVG;
- baca absorbansi larutan baku kerja, larutan contoh, dan larutan blanko menggunakan SSA tanpa nyala pada panjang gelombang 253,7 nm;
- buat kurva kalibrasi antara konsentrasi logam ( $\mu\text{g/mL}$ ) sebagai sumbu X dan absorbansi sebagai sumbu Y;
- plot hasil pembacaan larutan contoh terhadap kurva kalibrasi (C);
- lakukan pengerjaan duplo; dan
- hitung kandungan Hg dalam contoh.

##### A.8.3.4.2 Destruksi menggunakan *microwave digester* atau destruksi sistem tertutup

- Timbang 1 g contoh (W) ke dalam tabung destruksi dan tambahkan 5 mL  $\text{HNO}_3$ , 1 mL  $\text{H}_2\text{O}_2$  kemudian tutup rapat;
- masukkan ke dalam *microwave digester* dan kerjakan sesuai dengan petunjuk pemakaian alat;
- pindahkan larutan destruksi contoh ke dalam labu ukur 50 mL secara kuantitatif dan encerkan dengan akuades sampai tanda garis (V);
- siapkan larutan blanko dengan penambahan pereaksi dan perlakuan yang sama seperti contoh;
- tambahkan larutan pereduksi ke dalam larutan baku kerja, larutan contoh, dan larutan blanko pada alat HVG;
- baca absorban larutan baku kerja, larutan contoh, dan larutan blanko menggunakan SSA tanpa nyala pada panjang gelombang 253,7 nm;
- buat kurva kalibrasi antara konsentrasi logam ( $\mu\text{g/mL}$ ) sebagai sumbu X dan absorbansi sebagai sumbu Y;
- plot hasil pembacaan larutan contoh terhadap kurva kalibrasi (C);
- lakukan pengerjaan duplo; dan
- hitung kandungan Hg dalam contoh.



### A.8.3.5 Perhitungan

$$\text{Kandungan merkuri (Hg) (mg/kg)} = \frac{C}{W} \times V \times fp$$

#### Keterangan:

- C adalah konsentrasi merkuri (Hg) dari kurva kalibrasi, dinyatakan dalam mikrogram per mililiter ( $\mu\text{g/mL}$ );  
 V adalah volume larutan akhir, dinyatakan dalam mililiter (mL);  
 W adalah bobot contoh, dinyatakan dalam gram (g);  
 fp adalah faktor pengenceran.

### A.8.3.6 Ketelitian

Kisaran hasil dua kali ulangan RSD (*relative standard deviation*) maksimum 16%. Jika RSD lebih besar dari 16%, maka analisis harus diulang kembali.

## A.9 Cemarkan arsen (As)

### A.9.1 Prinsip

Contoh didestruksi dengan asam menjadi larutan arsen. Larutan  $\text{As}^{5+}$  direduksi dengan KI menjadi  $\text{As}^{3+}$  dan direaksikan dengan  $\text{NaBH}_4$  atau  $\text{SnCl}_2$  sehingga terbentuk  $\text{AsH}_3$  yang kemudian dibaca dengan SSA pada panjang gelombang maksimum 193,7 nm.

### A.9.2 Peralatan

- SSA yang dilengkapi dengan lampu katoda As dan generator uap hidrida (HVG) terkalibrasi;
- Tanur terkalibrasi dengan ketelitian  $1^\circ\text{C}$ ;
- Microwave digester*;
- Neraca analitik terkalibrasi dengan ketelitian 0,1 mg;
- Pemanas listrik;
- Burner* atau *bunsen*;
- Labu *Kjeldahl* 250 mL;
- Labu terbuat dari borosilikat berdasar bulat 50 mL;
- Labu ukur 1 000 mL, 500 mL, 100 mL, dan 50 mL terkalibrasi;
- Gelas ukur 25 mL;
- Pipet volumetrik 25 mL terkalibrasi;
- Pipet ukur berskala 0,05 mL atau mikro buret terkalibrasi;
- Cawan porselen 50 mL; dan
- Gelas piala 200 mL.

### A.9.3 Pereaksi

- Asam nitrat,  $\text{HNO}_3$  pekat;
- Asam sulfat,  $\text{H}_2\text{SO}_4$  pekat;
- Asam perklorat,  $\text{HClO}_4$  pekat;
- Ammonium oksalat,  $(\text{NH}_4)_2\text{C}_2\text{O}_4$  jenuh;
- Hidrogen peroksida,  $\text{H}_2\text{O}_2$  pekat;
- Larutan natrium borohidrida,  $\text{NaBH}_4$  4%;  
 larutkan 3 g  $\text{NaBH}_4$  dan 3 g  $\text{NaOH}$  dengan akuades sampai tanda garis dalam labu ukur 500 mL.



- g) Larutan asam klorida, HCl 8 M;  
larutkan 66 mL HCl pekat kedalam labu ukur 100 mL dan encerkan dengan akuades sampai tanda garis.
- h) Larutan timah (II) klorida,  $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  10%;  
timbang 50 g  $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  ke dalam gelas piala 200 mL dan tambahkan 100 mL HCl pekat. Panaskan hingga larutan jernih dan dinginkan kemudian tuangkan ke dalam labu ukur 500 mL dan encerkan dengan akuades sampai tanda garis.
- i) Larutan kalium iodida, KI 20%;  
timbang 20 g KI ke dalam labu ukur 100 mL dan encerkan dengan akuades sampai tanda garis (larutan harus dibuat langsung sebelum digunakan).
- j) Larutan  $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$  75 mg/mL;  
larutkan 3,75 g MgO dengan 30 mL  $\text{H}_2\text{O}$  secara hati-hati, tambahkan 10 mL  $\text{HNO}_3$ , dinginkan dan encerkan hingga 50 mL dengan akuades;
- k) Larutan baku 1000  $\mu\text{g/mL}$  As;  
larutkan 1,3203 g  $\text{As}_2\text{O}_3$  kering dengan sedikit NaOH 20% dan netralkan dengan HCl atau  $\text{HNO}_3$  1:1 (1 bagian asam : 1 bagian air). Masukkan ke dalam labu ukur 1000 mL dan encerkan dengan akuades sampai tanda garis.
- l) Larutan baku 100  $\mu\text{g/mL}$  As;  
pipet 10 mL larutan baku As 1000  $\mu\text{g/mL}$  ke dalam labu ukur 100 mL dan encerkan dengan akuades sampai tanda garis. Larutan baku kedua ini memiliki konsentrasi 100  $\mu\text{g/mL}$  As.
- m) Larutan baku 1  $\mu\text{g/mL}$  As; dan  
pipet 1 mL larutan baku As 100  $\mu\text{g/mL}$  ke dalam labu ukur 100 mL dan encerkan dengan akuades sampai tanda garis. Larutan baku ketiga ini memiliki konsentrasi 1  $\mu\text{g/mL}$  As.
- n) Larutan baku kerja As.  
pipet masing-masing 1,0 mL; 2,0 mL; 3,0 mL; 4,0 mL dan 5,0 mL larutan baku 1  $\mu\text{g/mL}$  As ke dalam labu ukur 100 mL terpisah dan encerkan dengan akuades sampai tanda garis kemudian kocok. Larutan baku kerja ini memiliki konsentrasi 0,01  $\mu\text{g/mL}$ ; 0,02  $\mu\text{g/mL}$ ; 0,03  $\mu\text{g/mL}$ ; 0,04  $\mu\text{g/mL}$  dan 0,05  $\mu\text{g/mL}$  As.

#### A.9.4 Cara kerja

##### A.9.4.1 Pengabuan basah

- a) Timbang 5 g sampai dengan 10 g contoh (W) ke dalam labu *Kjeldahl* 250 mL, tambahkan 5 mL sampai dengan 10 mL  $\text{HNO}_3$  pekat dan 4 mL sampai dengan 8 mL  $\text{H}_2\text{SO}_4$  pekat dengan hati-hati;
- b) setelah reaksi selesai, panaskan dan tambahkan  $\text{HNO}_3$  pekat sedikit demi sedikit sehingga contoh berwarna coklat atau kehitaman;
- c) tambahkan 2 mL  $\text{HClO}_4$  70% sedikit demi sedikit dan panaskan lagi sehingga larutan menjadi jernih atau berwarna kuning (jika terjadi pengarangan setelah penambahan  $\text{HClO}_4$ , tambahkan lagi sedikit  $\text{HNO}_3$  pekat);
- d) dinginkan, tambahkan 15 mL  $\text{H}_2\text{O}$  dan 5 mL  $(\text{NH}_4)_2\text{C}_2\text{O}_4$  jenuh;
- e) panaskan sehingga timbul uap  $\text{SO}_3$  di leher labu;
- f) dinginkan, pindahkan secara kuantitatif ke dalam labu ukur 50 mL dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis (V);
- g) pipet 25 mL larutan diatas dan tambahkan 2 mL HCl 8 M, 0,1 mL KI 20% kemudian kocok dan biarkan minimum 2 menit;
- h) siapkan larutan blanko dengan penambahan pereaksi dan perlakuan yang sama seperti contoh;
- i) tambahkan larutan pereduksi ( $\text{NaBH}_4$ ) ke dalam larutan baku kerja As, larutan contoh, dan larutan blanko pada alat HVG;
- j) baca absorbansi larutan baku kerja, larutan contoh, dan larutan blanko menggunakan SSA tanpa nyala pada panjang gelombang 193,7 nm;



- k) buat kurva kalibrasi antara konsentrasi logam ( $\mu\text{g/mL}$ ) sebagai sumbu X dan absorbansi sebagai sumbu Y;
- l) plot hasil pembacaan larutan contoh terhadap kurva kalibrasi (C);
- m) lakukan pengerjaan duplo; dan
- n) hitung kandungan As dalam contoh.

#### A.9.4.2 Destruksi menggunakan *microwave digester* atau destruksi sistem tertutup

- a) Timbang 1 g contoh (W) ke dalam tabung destruksi dan tambahkan 5 mL  $\text{HNO}_3$ , 1 mL  $\text{H}_2\text{O}_2$  kemudian tutup rapat;
- b) masukkan ke dalam *microwave digester* dan kerjakan sesuai dengan petunjuk pemakaian alat;
- c) setelah dingin, pindahkan larutan destruksi ke dalam labu ukur 25 mL secara kuantitatif dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis (V);
- d) pipet 10 mL larutan destruksi ke dalam labu borosilikat berdasar bulat 50 mL, tambahkan 1 mL larutan  $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ , uapkan di atas pemanas listrik hingga kering dan arangkan. Abukan dalam tanur dengan temperatur  $450^\circ\text{C}$  ( $\pm 1$  jam);
- e) dinginkan, larutkan dengan 2,0 mL  $\text{HCl}$  8 M, 0,1 mL  $\text{KI}$  20 % dan biarkan minimum 2 menit. Tuangkan larutan tersebut ke dalam tabung contoh pada alat;
- f) siapkan  $\text{NaBH}_4$  dan  $\text{HCl}$  dalam tempat yang sesuai dengan yang ditentukan oleh alat;
- g) tuangkan larutan baku kerja As 0,01  $\mu\text{g/mL}$ ; 0,02  $\mu\text{g/mL}$ ; 0,03  $\mu\text{g/mL}$ ; 0,04  $\mu\text{g/mL}$ ; 0,05  $\mu\text{g/mL}$  serta blanko ke dalam 6 tabung contoh lainnya. Nyalakan *burner* atau *bunsen* serta tombol pengatur aliran pereaksi dan aliran contoh;
- h) baca nilai absorbansi tertinggi larutan baku kerja As dan contoh dengan blanko sebagai koreksi;
- i) buat kurva kalibrasi antara konsentrasi As ( $\mu\text{g/mL}$ ) sebagai sumbu X dan absorbansi sebagai sumbu Y;
- j) plot hasil pembacaan larutan contoh terhadap kurva kalibrasi (C);
- k) lakukan pengerjaan duplo; dan
- l) hitung kandungan As dalam contoh.

#### A.9.5 Perhitungan

$$\text{Kandungan arsen (As) (mg/kg)} = \frac{C}{W} \times V \times fp$$

##### Keterangan:

- C adalah konsentrasi arsen (As) dari kurva kalibrasi, dinyatakan dalam mikrogram per miliiliter ( $\mu\text{g/mL}$ );
- V adalah volume larutan akhir, dinyatakan dalam mililiter (mL);
- W adalah bobot contoh, dinyatakan dalam gram (g);
- fp adalah faktor pengenceran.

#### A.9.6 Ketelitian

Kisaran hasil dua kali ulangan RSD (*relative standard deviation*) maksimum 16%. Jika RSD lebih besar dari 16%, maka analisis harus diulang kembali.



## A.10 Cemarkan mikroba

### A.10.1 Persiapan dan homogenisasi contoh untuk uji angka lempeng total

#### A.10.1.1 Prinsip

Pembebasan sel-sel bakteri yang mungkin terlindung oleh partikel makanan dan untuk mengaktifkan kembali sel-sel bakteri yang mungkin viabilitasnya berkurang karena kondisi yang kurang menguntungkan dalam makanan. Persiapan dan homogenisasi contoh bertujuan agar bakteri terdistribusi dengan baik di dalam contoh makanan yang ditetapkan.

#### A.10.1.2 Peralatan

- Alat homogenisasi (blender) dengan kecepatan 10 000 rpm sampai dengan 12 000 rpm;
- Autoklaf;
- Neraca kapasitas 2 000 g terkalibrasi dengan ketelitian 0,1 g;
- Pemanas listrik;
- Labu ukur 1 000 mL, 500 mL, 100 mL, dan 50 mL terkalibrasi;
- Gelas piala steril;
- Erlenmeyer steril;
- Botol pengencer steril;
- Pipet volumetrik steril 10,0 mL dan 1,0 mL terkalibrasi, dilengkapi dengan *bulb* dan *pipettor*;
- Tabung reaksi; dan
- Sendok, gunting, dan spatula steril.

#### A.10.1.3 Larutan pengencer

##### *Buffered peptone water (BPW)*

- |                            |       |
|----------------------------|-------|
| - Peptone                  | 10 g  |
| - Natrium klorida          | 5 g   |
| - Disodium hidrogen fosfat | 3,5 g |
| - Kalium dihidrogen fosfat | 1,5 g |
| - Air suling               | 1 L   |

Larutkan bahan-bahan di atas menjadi 1 L dengan air suling dan atur pH menjadi 7,0. Masukkan ke dalam botol pengencer. Sterilkan menggunakan autoklaf pada temperatur 121 °C selama 15 menit.

#### A.10.1.4 .Homogenisasi contoh

- Timbang 25 g contoh secara aseptik ke dalam botol pengencer yang telah berisi 225 mL larutan pengencer steril sehingga diperoleh pengenceran 1:10; dan
- kocok campuran beberapa kali sehingga homogen.

### A.10.2 Angka lempeng total

#### A.10.2.1 Prinsip

Pertumbuhan bakteri mesofil aerob setelah contoh diinkubasikan dalam pembenihan yang sesuai selama 72 jam pada temperatur (30 ± 1) °C.

#### A.10.2.2 Peralatan

- Inkubator (30 ± 1) °C, terkalibrasi;



- b) Oven/alat sterilisasi kering terkalibrasi;
- c) Autoklaf;
- d) Penangas air bersirkulasi ( $45 \pm 1$ ) °C;
- e) Alat penghitung koloni;
- f) Botol pengencer 160 mL terbuat dari gelas borosilikat, dengan sumbat karet atau tutup ulir plastik;
- g) Pipet ukur 1 mL steril dengan skala 0,1 mL dilengkapi *bulb* dan *pipettor*, dan
- h) Cawan Petri gelas/plastik (berukuran minimum 15 mm x 90 mm), steril.

#### A.10.2.3 Pembenihan dan pengencer

##### a) Buffered peptone water (BPW)

- Peptone 10 g
- Natrium klorida 5 g
- Disodium hidrogen fosfat 3,5 g
- Kalium dihidrogen fosfat 1,5 g
- Air suling 1 L

Larutkan bahan-bahan diatas menjadi 1 000 mL dengan air suling dan atur pH menjadi 7,0. Masukkan ke dalam botol pengencer. Sterilkan dengan menggunakan autoklaf pada temperatur 121 °C selama 15 menit.

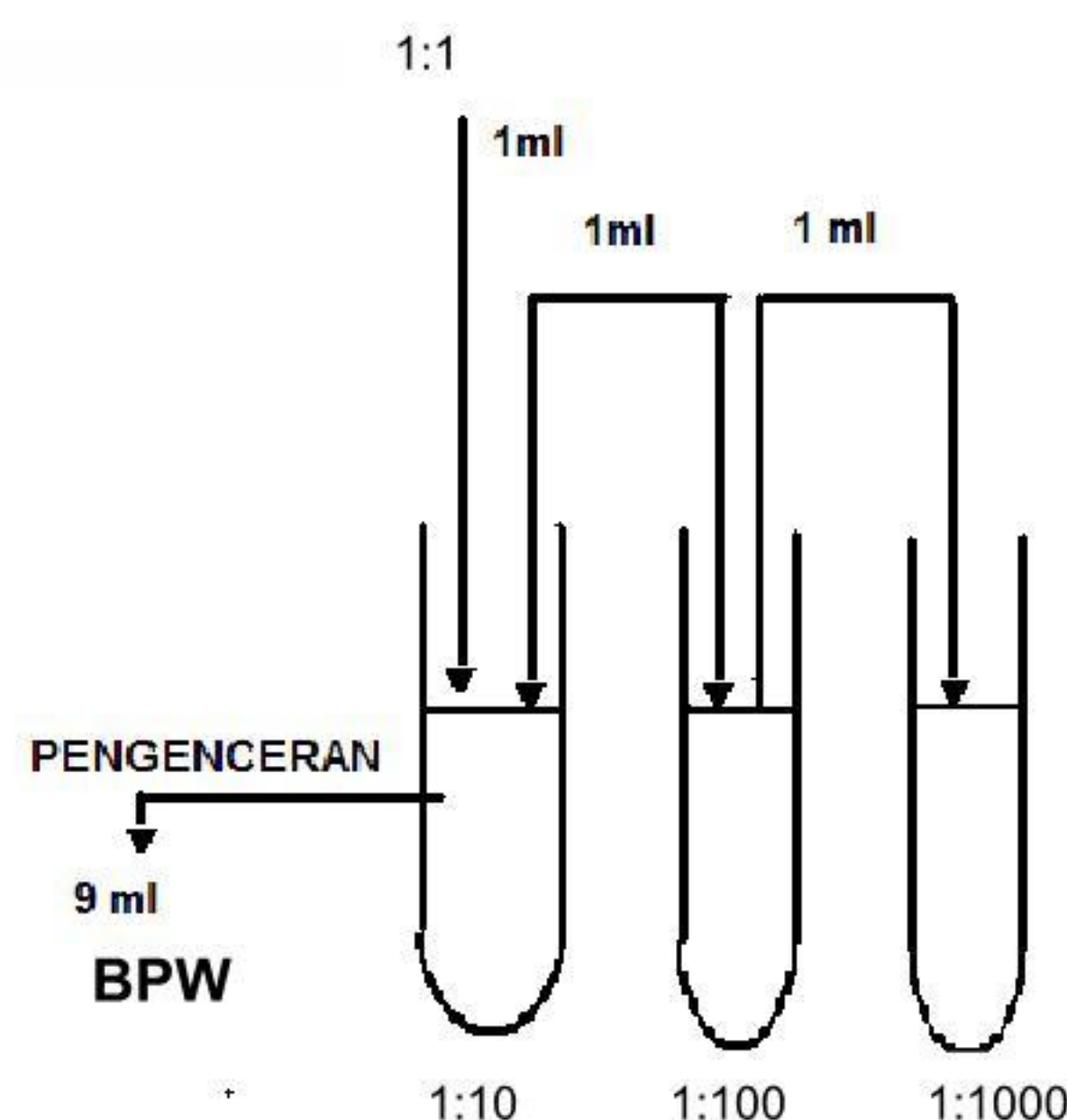
##### b) *Plate count agar* (PCA)

- Yeast extract 2,5 g
- Pancreatic digest of caseine 5 g
- Glukosa 1 g
- Agar 15 sampai dengan 20 g
- Air suling 1 L

Larutkan semua bahan-bahan, atur pH 7,0. Masukkan dalam labu, sterilkan pada 121 °C selama 15 menit.

#### A.10.2.4 Cara kerja

- a) Timbang 25 g contoh, masukkan ke dalam erlenmeyer yang telah berisi 225 mL larutan pengencer hingga diperoleh pengenceran 1:10. Kocok campuran beberapa kali hingga homogen. Pengenceran dilakukan sampai tingkat pengenceran tertentu sesuai keperluan seperti pada Gambar A.2;
- b) Pipet masing-masing 1 mL dari pengenceran  $10^1$ -  $10^4$  ke dalam cawan Petri steril secara duplo.



**Gambar A.2 - Tingkat pengenceran menggunakan larutan pengencer *Buffer Peptone Water* (BPW)**



- c) Ke dalam setiap cawan Petri tuangkan sebanyak 12 mL sampai dengan 15 mL media PCA yang telah dicairkan yang bertemperatur  $(45 \pm 1) ^\circ\text{C}$  dalam waktu 15 menit dari pengenceran pertama;
- d) Goyangkan cawan Petri dengan hati-hati (putar dan goyangkan ke depan dan ke belakang serta ke kanan dan ke kiri) hingga contoh tercampur rata dengan pembenihan;
- e) Kerjakan pemeriksaan blanko dengan mencampur air pengencer dengan pembenihan untuk setiap contoh yang diperiksa;
- f) Biarkan hingga campuran dalam cawan Petri membeku;
- g) Masukkan semua cawan Petri dengan posisi terbalik ke dalam lemari pengering dan inkubasikan pada temperatur  $30 ^\circ\text{C}$  selama 72 jam;
- h) Catat pertumbuhan koloni pada setiap cawan Petri yang mengandung (25 - 250) koloni setelah 72 jam;
- i) Hitung angka lempeng total dalam 1 g contoh dengan mengalikan jumlah rata-rata koloni pada cawan Petri dengan faktor pengenceran yang digunakan.

#### A.10.2.5 Perhitungan

$$\text{Angka lempeng total (koloni/g)} = n \times F$$

##### Keterangan:

- n adalah rata-rata koloni dari dua cawan Petri dari satu pengenceran, dinyatakan dalam koloni per gram (koloni/g);  
F adalah faktor pengenceran dari rata-rata koloni yang dipakai.

#### A.10.2.6 Pernyataan hasil

##### A.10.2.6.1 Cara menghitung

- a) Pilih cawan Petri dari satu pengenceran yang menunjukkan jumlah koloni antara 25 koloni sampai dengan 250 koloni setiap cawan Petri. Hitung semua koloni dalam cawan Petri menggunakan alat penghitung koloni. Hitung rata-rata jumlah koloni dan kalikan dengan faktor pengenceran. Nyatakan hasilnya sebagai jumlah bakteri per gram;
- b) jika salah satu dari dua cawan Petri terdapat jumlah koloni lebih kecil dari 25 koloni atau lebih besar dari 250 koloni, hitung jumlah koloni yang terletak antara 25 koloni sampai dengan 250 koloni dan kalikan dengan faktor pengenceran. Nyatakan hasilnya sebagai jumlah bakteri per gram;

Contoh :

$10^{-2}$	$10^{-3}$
120	25
105	20

$$\text{ALT} = \frac{120 + 105 + 25}{[(1 \times 2) + (0,1 \times 1) \times 10^{-2}]} = 124,9375$$

- c) jika hasil dari dua pengenceran jumlahnya berturut-turut terletak antara 25 koloni sampai dengan 250 koloni, hitung jumlah koloni dari masing-masing pengenceran koloni per g dengan rumus :

$$\text{ALT} = \frac{\sum C}{[(1 \times n_1) + (0,1 \times n_2) \times d]}$$

##### Keterangan:



- C adalah jumlah koloni dari tiap-tiap cawan Petri;  
 $n_1$  adalah jumlah cawan Petri dari pengenceran pertama yang dihitung;  
 $n_2$  adalah jumlah cawan Petri dari pengenceran kedua;  
d adalah pengenceran pertama yang dihitung.

Contoh :

$10^{-2}$	$10^{-3}$
131	30
143	25

$$ALT = \frac{131 + 143 + 30 + 25}{[(1 \times 2) + (0,1 \times 2) \times 10^{-2}]} = 164,3357$$

- d) jika jumlah koloni dari masing-masing cawan Petri lebih dari 25 koloni nyatakan sebagai jumlah bakteri perkiraan;  
– jika jumlah koloni per  $\text{cm}^2$  kurang dari 100 koloni, maka nyatakan hasilnya sebagai jumlah perkiraan : jumlah bakteri dikalikan faktor pengenceran.

Contoh :

$10^{-2}$	$10^{-3}$	Jumlah bakteri perkiraan
~	640	$1\,000 \times 640 = 640\,000 (6.4 \times 10^5)$

- jika jumlah koloni per  $\text{cm}^2$  lebih dari 100 koloni, maka nyatakan hasilnya:  
area x faktor pengenceran x 100 contoh rata-rata jumlah koloni 110 per  $\text{cm}^2$

Contoh :

$10^{-2}$	$10^{-3}$	area ( $\text{cm}^2$ )	jumlah bakteri perkiraan
~	7 150	65	$> 65 \times 10^3 \times 100 = > 6\,500\,000 (6.5 \times 10^6)$
~	6 490	59	$> 59 \times 10^3 \times 100 = > 5\,900\,000 (5.9 \times 10^6)$

- e) jika jumlah koloni dari masing-masing koloni yang tumbuh pada cawan Petri kurang dari 25, maka nyatakan jumlah bakteri perkiraan lebih kecil dari 25 koloni dikalikan pengenceran yang terendah; dan  
f) menghitung koloni yang merambat;  
Perambatan pada koloni ada 3 macam, yaitu :  
– perambatan berupa rantai yang tidak terpisah;  
– perambatan yang terjadi diantara dasar cawan Petri dan pembenihan; dan  
– perambatan yang terjadi pada pinggir atau permukaan pembenihan.  
Jika terjadi hanya satu perambatan (seperti rantai) maka koloni dianggap satu. Jika terbentuk lebih dari satu perambatan dan berasal dari sumber yang terpisah-pisah, maka tiap sumber dihitung sebagai satu koloni.  
g) jika tidak ada koloni yang tumbuh pada cawan Petri, nyatakan hasil sebagai nol koloni per gram dikalikan dengan faktor pengenceran terendah ( $<10$ ).

#### A.10.2.6.2 Cara membulatkan angka

Dalam melaporkan jumlah koloni atau jumlah koloni perkiraan hanya 2 angka penting yang digunakan, yaitu angka pertama dan kedua (dimulai dari kiri):

- a) Jika angka ketiga lebih besar dari 5, maka bulatkan ke atas;  
contohnya : 528 dilaporkan sebagai 530 penulisannya  $5,3 \times 10^2$   
b) jika angka ketiga kurang dari 5, maka bulatkan kebawah; dan  
contohnya : 523 dilaporkan sebagai 520 penulisannya  $5,2 \times 10^2$   
c) jika angka ketiga sama dengan 5, maka bulatkan sebagai berikut:  
– bulatkan ke atas jika angka kedua merupakan angka ganjil; dan  
contohnya : 575 dilaporkan sebagai 580 penulisannya  $5,8 \times 10^2$   
– bulatkan ke bawah jika angka kedua merupakan angka genap.  
contohnya : 565 dilaporkan sebagai 560 penulisannya  $5,6 \times 10^2$

#### A.10.3 Salmonella



**A.10.3.1 Prinsip**

Contoh yang diuji ditumbuhkan terlebih dahulu pada media pra pengkayaan dan kemudian ditumbuhkan pada media pengkayaan, dan kemudian dilanjutkan pada media selektif. Selanjutnya contoh dideteksi dengan menumbuhkannya pada media agar selektif. Koloni-koloni yang diduga *Salmonella* sp. pada media selektif kemudian diisolasi dan dilanjutkan dengan ditegaskan melalui uji biokimia dan uji serologi untuk meyakinkan ada atau tidaknya bakteri *Salmonella* sp.

**A.10.3.2 Peralatan**

- a) Inkubator ( $37 \pm 1$ ) °C;
- b) Autoklaf;
- c) Oven;
- d) Neraca, kapasitas 2000 g, dengan ketelitian 0,1 g;
- e) Neraca, kapasitas 120 g, dengan ketelitian 5 mg;
- f) Penangas air, (44 sampai dengan 47) °C;
- g) Penangas air, bersirkulasi, *thermostatically-controlled*, ( $41,5 \pm 1$ ) °C;
- h) Penangas air bertemperatur ( $37 \pm 1$ ) °C;
- i) pH meter;
- j) Blender dan blender jar (botol) steril;
- k) Botol bertutup ulir bermulut lebar (500 mL) steril, *Erlenmeyer* 500 mL steril, *beaker*, 250 mL steril, *sterile glass* atau *paper funnels* dengan ukuran sesuai, dan, pilihan lain, kontainer dengan kapasitas sesuai untuk mengakomodasi contoh komposit;
- l) *Bent glass* atau batang penyebar plastik steril;
- m) Sendok steril, atau peralatan lain untuk memindahkan contoh makanan;
- n) Cawan petri steril, 15 x 100 mm, kaca atau plastik;
- o) Pipet steril, 1 mL dengan ketelitian 0,01 mL; dan pipet steril 5 mL dan 10 mL dengan skala 0,1 mL;
- p) Jarum Ose (diameter  $\pm 3$  mm), terbuat dari *nichrome*, *platinum-iridium chromel wire* atau plastik steril;
- q) Jarum Ose yang berujung runcing;
- r) Tabung reaksi atau tabung biakan steril, 16 x 150 mm dan 20 x 150 mm; tabung serologikal, 10 x 75 mm atau 13 x 100 mm;
- s) Botol pengencer 500 mL;
- t) Rak tabung reaksi atau rak tabung biakan;
- u) *Vortex mixer*;
- v) Lampu (untuk mengamati reaksi serologi);
- w) *Fisher* atau *Bunsen burner*;
- x) Kertas pH (kisaran pH 6 sampai dengan 8) dengan ketelitian maksimum 0,4 unit pH per perubahan warna; dan
- y) Gunting, gunting besar, pisau bedah, dan *forceps* steril.

**A.10.3.3 Perbenihan dan pereaksi**

- a) *Buffered peptone water* (BPW);
- b) Media *Rappaport-Vassiliadis with soya* (RVS broth);
- c) *Muller – Kauffmann Tetrathionate / novobiocin* (MKTTn) broth;
- d) *Xylose lysine desoxycholate* (XLD) agar;
- e) *Hektoen enteric* (HE) agar;
- f) *Bismuth sulfite* (BS) agar;
- g) *Triple sugar iron* (TSI) agar;
- h) Urea agar;
- i) *Lysine decarboxylase broth* (LDB);



- j) Larutan *physiological saline*, 0,85% (steril);
- k) Toluene;
- l) Kertas cakram  $\beta$ -galaktosidase;
- m) Media Voges-Proskauer (VP);
- n) Pereaksi uji Voges-Proskauer (VP);
- o) Larutan *creatine*;
- p) 1-*naphtol* yang dilarutkan dengan etanol;
- q) Larutan potasium hidroksida (KOH), 40%;
- r) *Tryptone* (atau *tryptophane*) *broth* (TB);
- s) Pereaksi Kovacs;
- t) *Semi-solid Nutrient Agar* (NA);
- u) *Salmonella monovalent* dan *polyvalent somatic* (O) *antiserum*;
- v) *Salmonella monovalent* dan *polyvalent flagellar* (H) *antiserum*; dan
- w) *Salmonella anti-Vi* sera.

#### A.10.3.4 Cara Kerja

##### A.10.3.4.1 Homogenisasi contoh dan pra-pengkayaan

- a) Timbang 25 g contoh ke dalam blender yang steril dan tambahkan 225 mL BPW steril. Kocok selama 2 menit;
- b) inkubasikan pada temperatur  $(37 \pm 1) ^\circ\text{C}$  selama  $(18 \pm 2)$  jam.

##### A.10.3.4.2 Pengkayaan

- a) Pipet 0,1 mL biakan pra-pengkayaan ke dalam 10 mL media RVS dan 1 mL biakan pra-pengkayaan lainnya ke dalam 10 mL MKTTn *broth* dan vorteks masing-masing campuran tersebut; dan
- b) inkubasikan media RVS pada temperatur  $(41,5 \pm 1) ^\circ\text{C}$  selama  $(24 \pm 3)$  jam dalam penangas air bersirkulasi dan MKTTn *broth* pada  $(37 \pm 1) ^\circ\text{C}$  selama  $(24 \pm 3)$  jam.

##### A.10.3.4.3 Penanaman pada pembenihan pilihan/selektif

- a) Kocok contoh yang telah diinkubasi dan dengan menggunakan jarum Ose diameter 3 mm, goreskan biakan pengkayaan MKTTn *broth* ke dalam cawan Petri yang berisi media agar XLD, HE dan BS. Siapkan agar BS sehari sebelum digunakan dan simpan di tempat gelap pada temperatur ruang sampai siap digores;
- b) ulangi cara di atas dari media agar pengkayaan RVS;
- c) inkubasikan cawan-cawan media agar BS, HE dan XLD selama  $(24 \pm 3)$  jam pada temperatur  $37 ^\circ\text{C}$ ;
- d) amati kemungkinan adanya koloni *Salmonella* sp., setelah inkubasi  $(24 \pm 3)$  jam. Ambil 2 atau lebih koloni *Salmonella* sp. dari masing-masing media agar selektif setelah inkubasi  $(24 \pm 3)$  jam. Morfologi koloni mempunyai ciri-ciri sebagai berikut:
  - XLD : koloni berwarna merah jambu (pink) dengan atau tanpa inti hitam.  
Kebanyakan *Salmonella* sp. membentuk koloni besar, inti hitam mengkilap atau mungkin nampak hampir semuanya berwarna hitam;
  - HE : koloni berwarna hijau kebiruan sampai biru dengan atau tanpa inti hitam.  
Kebanyakan *Salmonella* sp. membentuk koloni besar, inti hitam mengkilat atau mungkin nampak hampir semuanya berwarna hitam.
  - BS : koloni berwarna coklat, abu-abu sampai hitam dan kadang-kadang kilap logam.  
Jika masa inkubasi bertambah maka warna media disekitar koloni mula-mula coklat kemudian menjadi hitam. Pada beberapa strain koloni berwarna hijau dengan atau tanpa warna gelap disekitar media.



- e) jika tidak ada koloni yang diduga *Salmonella* sp. pada media agar BS setelah inkubasi ( $24 \pm 3$ ) jam, jangan mengambil koloni tapi inkubasi kembali media selama ( $24 \pm 3$ ) jam. Jika tidak ada koloni yang diduga *Salmonella* sp. pada media agar BS setelah inkubasi ( $48 \pm 2$ ) jam, ambil 2 atau lebih koloni tersebut.

#### A.10.3.4.4 Uji penegasan

##### A.10.3.4.4.1 Seleksi koloni untuk uji penegasan

- Ambil sedikitnya 1 koloni tipikal pada masing-masing cawan yang berisi media XLD, HE, dan BS, ambil kembali sedikitnya 4 koloni bila koloni pertama tidak tipikal;
- goreskan masing-masing koloni tersebut pada cawan yang berisi NA yang akan ditumbuhkan oleh koloni yang terisolasi dengan baik, kemudian inkubasikan pada temperatur ( $37 \pm 1$ ) °C selama ( $24 \pm 3$ ) jam;
- gunakan kultur murni untuk uji penegasan biokimia dan serologi selanjutnya.

##### A.10.3.4.4.2 Uji penegasan biokimia

- Dengan menggunakan jarum Ose berujung runcing steril, ambil secara hati-hati bagian tengah koloni dan inokulasikan ke dalam media TSI agar miring dengan cara menggores agar miring dan menusuk agar tegak;
- inkubasi agar miring TSI pada temperatur ( $37 \pm 1$ ) °C selama ( $24 \pm 3$ ) jam. Pada TSI, perubahan yang terjadi pada medium adalah sebagai berikut: bagian tegak:
 

kuning	glukosa positif
merah atau tak berubah warna	glukosa negatif
hitam	pembentukan H <sub>2</sub> S
gelembung atau retak	pembentukan gas dari glukosa

 - permukaan agar miring:
 

kuning	laktosa dan/atau sukrosa positif
merah atau tak berubah warna	laktosa dan sukrosa negatif

 90% kasus tipikal *Salmonella* positif membentuk gelembung gas dan H<sub>2</sub>S (warna hitam);
- dengan menggunakan jarum Ose berujung runcing steril, ambil secara hati-hati bagian tengah koloni pada A.10.3.4.4.1 dan inokulasikan ke dalam media Urea agar dengan cara menggores agar miring;
- inkubasikan agar miring urea pada temperatur ( $37 \pm 1$ ) °C selama ( $24 \pm 3$ ) jam, dan amati setiap interval waktu tertentu. Pada Urea agar, reaksi positif ditunjukkan dengan reaksi pemecahan urea yang menghasilkan ammonia akan menunjukkan perubahan warna *phenol red* menjadi merah mawar hingga merah muda dan kemudian akan semakin pekat. Reaksi akan muncul setelah 2 jam sampai dengan 4 jam;
- dengan menggunakan jarum Ose steril, inokulasikan koloni pada A.10.3.4.4.1 ke dalam media LDB, kemudian inkubasikan pada ( $37 \pm 1$ ) °C selama ( $24 \pm 3$ ) jam, reaksi positif pada LDB ditandai dengan terbentuknya kekeruhan dan warna ungu setelah inkubasi. Warna kuning menunjukkan reaksi negatif;
- dengan menggunakan jarum Ose steril, inokulasikan koloni pada A.10.3.4.4.1 ke dalam tabung yang berisi 0,25 mL larutan *physiological saline* steril;
- tambahkan 1 tetes toluene dan kocok tabung. Tempatkan tabung pada penangas air bertemperatur 37 °C dan diamkan selama 5 menit, kemudian tambahkan sebanyak 1 lembar kertas cakram β- galaktosidase dan kocok hingga rata;
- inkubasikan tabung pada penangas air 37 °C dan diamkan selama ( $24 \pm 3$ ) jam, amati tabung pada interval waktu tertentu. Reaksi positif ditunjukkan dengan terbentuknya warna kuning. Reaksi muncul setelah 20 menit;
- dengan menggunakan jarum Ose steril, inokulasikan koloni pada A.10.3.4.4.1 ke dalam tabung steril yang berisi 3 mL media VP, kemudian inkubasikan pada temperatur ( $37 \pm 1$ ) °C selama ( $24 \pm 3$ ) jam;



- j) setelah inkubasi tambahkan dua tetes larutan *creatine*, tiga tetes larutan 1-*naphtol* yang dilarutkan dengan etanol, dan dua tetes larutan KOH 40%, kemudian kocok setelah penambahan tiap pereaksi tersebut. Reaksi positif ditunjukkan dengan terbentuknya warna merah terang setelah 15 menit;
- k) dengan menggunakan jarum Ose steril, inokulasikan koloni pada A.10.3.4.4.1 ke dalam tabung steril yang berisi media TB, kemudian inkubasikan pada temperatur  $(37 \pm 1) ^\circ\text{C}$  selama  $(24 \pm 3)$  jam; dan
- l) setelah inkubasi tambahkan 1 mL pereaksi *Kovacs*. Reaksi positif ditunjukkan dengan terbentuknya cincin yang berwarna merah, sedangkan pembentukan cincin berwarna kuning menunjukkan reaksi negatif.

#### A.10.3.4.4.3 Interpretasi hasil uji biokimia

Interpretasi hasil uji biokimia dapat dilihat pada Tabel A.2





Tabel A.2 – Interpretasi hasil uji biokimia

Uji biokimia	Galur <i>Salmonella</i>									
	<i>S. Typhi</i>		<i>S. Paratyphi A</i>		<i>S. Paratyphi B</i>		<i>S. Paratyphi C</i>		Galur lain	
	Reaksi	% <sup>a</sup>	Reaksi	% <sup>a</sup>	Reaksi	% <sup>b</sup>	Reaksi	% <sup>b</sup>	Reaksi	% <sup>a</sup>
TSI asam dari glukosa	+	100	+	100	+		+		+	100
TSI gas dari glukosa	- <sup>c</sup>	0	+	100	+		+		+	92
TSI asam dari laktosa	-	2	-	100	-		-		-	1
TSI asam dari sukrosa	-	0	-	0	-		-		-	1
TSI produksi H <sub>2</sub> S	+	97	-	10	+		+		+	92
Hidrolisis urea	-	0	-	0	-		-		-	1
<i>Lysine decarboxylation</i>	+	98	-	0	+		+		+	95
Reaksi $\beta$ -galactosidase	-	0	-	0	-		-		-	2 <sup>d</sup>
Reaksi Voges-Proskauer	-	0	-	0	-		-		-	0
Produksi indol	-	0	-	0	-		-		-	1

**CATATAN:**

<sup>a</sup> Persentase mengindikasikan bahwa tidak semua serotipe *Salmonella* menunjukkan reaksi yang ditunjukkan dengan + atau -. Persentase dapat bervariasi antar serotipe dan dalam serotipe dari *food poisoning serotype* dari lokasi yang berbeda

<sup>b</sup> Persentase tidak diketahui dari literatur

<sup>c</sup> *Salmonella Typhi* bersifat anaerogenik

<sup>d</sup> *Salmonella enterica* spp. *arizonae* memberikan reaksi laktosa positif atau negatif namun selalu menunjukkan reaksi positif pada  $\beta$ -galactosidase.



**A.10.3.4.4.4 Uji penegasan serologi dan serotyping**

Deteksi keberadaan antigen O-, Vi-, dan H- *Salmonella* diuji dengan aglutinasi (penggumpalan) dengan sera yang sesuai, dari kultur murni yang diperoleh pada A.11.3.4.4.1 dan setelah galur auto-aglutinasi dihilangkan.

**A.10.3.4.4.5 Penghilangan galur auto-aglutinasi**

- a) Tempatkan 1 tetes larutan *physiological saline* 0,85% pada gelas objek yang bersih;
- b) suspensikan sebanyak 1 Ose penuh biakan dari A.11.3.4.4.1 sampai terbentuk suspensi yang homogen dan keruh;
- c) goyangkan gelas objek selama 30 sampai dengan 60 detik dan amati gelas objek, bila bakteri mengelompok menjadi unit-unit terpisah maka galur tersebut termasuk auto-aglutinasi, dan tidak dilanjutkan untuk pengujian tahap selanjutnya.

**A.10.3.4.4.6 Uji antigen O-**

- a) Dengan menggunakan pensil, buat garis empat persegi-panjang berukuran 1 cm x 2 cm di atas kaca atau cawan Petri plastik berukuran 15 mm x 100 mm atau di atas gelas sediaan;
- b) gunakan koloni yang tidak termasuk galur auto-aglutinasi, tempatkan 1 tetes larutan *physiological saline* 0,85%;
- c) tambahkan 1 tetes larutan *saline* pada bagian pertama dan tambahkan 1 tetes antiserum O- ke dalam bagian yang lain;
- d) campurkan atau homogenkan bagian atas menggunakan jarum Ose yang bersih dan steril selama 1 menit; dan
- e) klasifikasi uji *antiserum O-* menunjukkan hasil sebagai berikut:  
 Positif : terjadi penggumpalan didalam pencampuran uji, pada kontrol *saline* tidak terjadi penggumpalan;  
 negatif : tidak terjadi penggumpalan didalam pencampuran uji, dan kontrol *saline*; dan  
 non spesifik : terjadi penggumpalan didalam pencampuran uji dan pada kontrol *saline*.

**A.10.3.4.4.7 Uji antigen Vi-**

- a) Dengan menggunakan pensil, buat garis empat persegi-panjang berukuran 1 cm x 2 cm di atas kaca atau cawan Petri plastik berukuran 15 mm x 100 mm atau di atas gelas sediaan;
- b) gunakan koloni yang tidak termasuk galur auto-aglutinasi, tempatkan 1 tetes larutan *physiological saline* 0,85%;
- c) tambahkan 1 tetes suspensi biakan di atas masing-masing bagian empat-persegi panjang yang telah diberi tanda dengan pensil;
- d) tambahkan 1 tetes larutan *saline* pada bagian pertama dan tambahkan 1 tetes antiserum Vi- ke dalam bagian yang lain;
- e) campurkan atau homogenkan bagian atas menggunakan jarum Ose yang bersih dan steril selama 1 menit; dan
- f) klasifikasi uji *antiserum Vi-* menunjukkan hasil sebagai berikut:  
 Positif : terjadi penggumpalan didalam pencampuran uji, pada kontrol *saline* tidak terjadi penggumpalan;  
 negatif : tidak terjadi penggumpalan didalam pencampuran uji, dan kontrol *saline*; dan  
 non spesifik : terjadi penggumpalan didalam pencampuran uji dan pada kontrol *saline*.

**A.10.3.4.4.8 Uji antigen H-**

- a) Inokulasikan media NA semi solid dengan koloni murni yang bukan merupakan galur auto-aglutinasi;



- b) inkubasikan media pada temperatur ( $37 \pm 1$ ) °C selama ( $24 \pm 3$ ) jam;
- c) dengan menggunakan pensil, buat garis empat persegi-panjang berukuran 1 cm x 2 cm di atas kaca atau cawan Petri plastik berukuran 15 mm x 100 mm atau di atas gelas sediaan;
- d) emulsikan biakan pada NA semi solid setelah inkubasi dengan 2 mL 0,85% *saline* menggunakan jarum Ose;
- e) tambahkan 1 tetes suspensi biakan tersebut di atas masing-masing bagian empat-persegi panjang yang telah diberi tanda dengan pensil;
- f) tambahkan 1 tetes larutan *saline* pada bagian pertama dan tambahkan 1 tetes antiserum H- ke dalam bagian yang lain;
- g) campurkan atau homogenkan bagian atas menggunakan jarum Ose yang bersih dan steril selama 1 menit; dan
- h) klasifikasi uji *antiserum* H- menunjukkan hasil sebagai berikut:  
 Positif : terjadi penggumpalan didalam pencampuran uji, pada kontrol *saline* tidak terjadi penggumpalan;  
 negatif : tidak terjadi penggumpalan didalam pencampuran uji, dan kontrol *saline*; dan  
 non spesifik : terjadi penggumpalan didalam pencampuran uji dan pada kontrol *saline*.

#### A.10.3.4.4.9 Interpretasi hasil uji penegasan

Interpretasi hasil uji serologi yang merupakan uji penegasan dapat dilihat pada Tabel A.3.

**Tabel A.3 – Interpretasi hasil uji penegasan**

Reaksi biokimia	Auto-aglutinasi	Reaksi serologi	Interpretasi
Tipikal	Tidak	Antigen O-, Vi-, atau H-positif	Galur dipertimbangkan sebagai <i>Salmonella</i>
Tipikal	Tidak	Semua reaksi negatif	Kemungkinan adalah <i>Salmonella</i>
Tipikal	Ya	Tidak diuji	
Tidak tipikal	Tidak / Ya	Antigen O-, Vi-, atau H-positif	Bukan <i>Salmonella</i>
Tidak tipikal	Tidak / Ya	Semua reaksi negatif	

#### A.10.3.5 Pernyataan Hasil

Berdasarkan hasil interpretasi dapat menunjukkan keberadaan *Salmonella* pada contoh uji per 25 gram.

### A.11 Aflatoksin M<sub>1</sub>

#### A.11.1 Prinsip

Aflatoksin M<sub>1</sub> dipisahkan dengan diekstraksi secara selektif menggunakan *Immuno Affinity Column* (IAC) yang mengandung antibody spesifik. Antibodi akan secara selektif mengikat aflatoksin M<sub>1</sub> (antigen) yang terkandung dalam ekstrak untuk membentuk kompleks antibodi-antigen. Komponen lainnya dicuci dari kolom dengan menggunakan air. Aflatoksin M<sub>1</sub> dari kolom dielusi dengan asetronitril, setelah eluat dijadikan konsentrat, jumlah aflatoksin M<sub>1</sub> ditetapkan secara Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) dengan detektor fluorometrik.



### A.11.2 Peralatan

- Seperangkat alat Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) yang dilengkapi dengan detektor fluoresen dan kolom (Octadecylsilane (ODS, ODS-1, ODS-2, ODS Hypersil, Nucleosil C18/ Cromospher C18/Nova-pak C18/LiChrosorb RP18/Nova-Pak C18/Microsphere C18 dengan dimensi (mm): 100 x 2,3; 4,6; 5; 125x4; 200x2,1; 3; 4; 250 x 4,6;);
- Vakum manifold;
- Penangas air;
- Sentrifuse;
- Magnetic stirrer*;
- Gelas piala 200 mL;
- Immuno Affinity Column (IAC)*;
- Pipet volumetrik terkalibrasi;
- Labu ukur 50 mL terkalibrasi;
- Tabung tertutup ulir 5 dan 10 mL;
- Mikrosiring 100, 250, dan 500  $\mu\text{L}$ ;
- Kertas saring standar kromatografi berukuran partikel 20 sampai dengan 25  $\mu\text{m}$ ; dan
- Vorteks.

### A.11.3 Pereaksi

- Phosphate Buffer Saline*, PBS;
  - Natrium klorida, NaCl p.a;
  - Nitrogen;
  - Kloroform;
  - Asetonitril;
  - Metanol;
  - Ultrapure water*;
  - Asam nitrat;
  - Air bebas ion;
  - Potassium bromide; dan
  - Larutan standar aflatoksin  $M_1$  1  $\mu\text{g/mL}$ ;
  - Larutan baku kerja aflatoksin 0,1  $\mu\text{g/mL}$ ;
- dengan menggunakan siring, injek 50  $\mu\text{L}$  larutan standar aflatoksin  $M_1$  (k) ke dalam vial coklat dan keringkan dengan nitrogen. Larutkan residu dengan 500 mL asetonitril, tutup rapat, vorteks dan simpan pada temperatur 4 °C (larutan stabil dalam 1 bulan);
- Larutan baku kalibrasi.
- siapkan larutan baku kerja (l) hingga temperatur ruang. Buat larutan deret baku dengan konsentrasi sesuai volume yang diinjek misal 0,05-1,0  $\mu\text{g}$  aflatoksin  $M_1$ .

### A.11.4 Cara Kerja 1 (tanpa derivatisasi)

#### A.11.4.1 Persiapan larutan contoh

- Hangatkan susu sebelum diuji pada temperatur 37 °C dengan waterbath;
- homogenkan dengan menggunakan *magnetic stirrer* untuk memisahkan lapisan lemak;
- sentrifuse susu pada kecepatan 2 000 xg untuk memisahkan lemak dan membuang lapisan tipis diatas lemak;
- saring dengan satu atau lebih kertas saring hingga diperoleh filtrat minimum 50 mL;
- siapkan IAC hingga mencapai temperatur ruang;
- elusikan 50 mL filtrat (Vs) ke dalam IAC dengan laju alir 2 mL/menit - 3 mL/menit (gunakan vakum manifold);
- cuci IAC dengan 20 mL air dengan laju alir tetap;



- h) keringkan IAC dengan menggunakan gas nitrogen;
- i) elusikan standar aflatoksin M<sub>1</sub> ke dalam IAC dengan 4 mL asetonitril murni;
- j) biarkan asetonitril kontak dengan IAC selama 60 detik;
- k) tampung hasil elusi metanol (eluat) dari IAC; dan
- l) evaporasi eluat sampai kering dengan menggunakan gas nitrogen; dan
- m) cairkan sampai volume (V<sub>f</sub>) dengan campuran larutan yang digunakan untuk fase gerak, misalnya 200 µl (untuk 50 µl injeksi) sampai 1000 µl untuk 250 µl injeksi).

#### A.11.4.2 Cara penetapan

Injeksikan larutan standar aflatoksin M<sub>1</sub> dan eluat masing-masing pada KCKT dengan kondisi sebagai berikut:

- Kolom C18 (panjang kolom 25 cm, diameter dalam 4,6 mm) atau yang sesuai
- Fase gerak (pilih salah satu) :

No.	Air	asetonitril	metanol	isopropanol
1.	75	25	-	-
2.	67	33	-	-
3.	65	25	10	-
4.	80	12	-	8

- Laju alir: 0,8 mL per menit
- Detektor : Fluoresens,  $\lambda$  Eksitasi sebesar 365 nm dan  $\lambda$  Emisi sebesar 435 nm
- Volume penyuntikan : masing-masing 50-200 µL

#### A.11.5 Cara Kerja 2 (derivatisasi dengan menggunakan *Kobra Cell*)

##### A.11.5.1 Persiapan contoh

- a) Hangatkan susu pada temperatur 30 sampai dengan 35 °C;
- b) elusikan 50 mL sampel kepada kolom IAC (V<sub>s</sub>);
- c) biarkan seluruh sampel melewati kolom secara gravitasi dengan laju alir 1 mL/menit sampai dengan 3 ml/menit ;
- d) cuci kolom dengan sebanyak 2 kali menggunakan 10 mL PBS (pH 7,4);
- e) keringkan IAC dengan menggunakan sistem vakum;
- f) elusikan 2 x 0,5 ml metanol;
- g) pindahkan 0,5 mL eluat ke dalam tabung vial *autosampler*;
- h) tambahkan 0,5 mL *ultrapure water* ke dalam tabung vial dan vorteks (V<sub>f</sub>); dan
- i) injek 100 µL ke dalam KCKT (V<sub>i</sub>).

##### A.11.5.2 Cara penetapan

Injeksikan masing-masing larutan standar aflatoksin M<sub>1</sub> dan eluat pada KCKT yang dilengkapi *Kobra Cell* dengan kondisi sebagai berikut:

- Kolom Zorbax SB-Aq
- Fase gerak: (air : asetonitril : metanol dengan perbandingan 5 : 1 : 1)  
Tambahkan 100 µL asam nitrat dan 0,3 g potassium bromide pada setiap liter fase gerak untuk *post column bromine derivatization* dengan *Kobra Cell*.
- Laju alir: 2 mL per menit
- Detektor: Fluoresens,  $\lambda$  Eksitasi sebesar 360 nm dan  $\lambda$  Emisi sebesar 440 nm
- Volume penyuntikan : masing-masing 100 µL



### A.11.5.3 Interpretasi Hasil

Perhitungan konsentrasi massa aflatoksin M<sub>1</sub> dapat menggunakan rumus sebagai berikut;

$$W_m = W_a \times \left( \frac{V_f}{V_i} \right) \times \left( \frac{1}{V_s} \right)$$

**Keterangan:**

- W<sub>m</sub> adalah volume aflatoksin M<sub>1</sub> pada sampel (ng/mL) atau (µg/mL);  
 W<sub>a</sub> adalah tinggi atau area peak aflatoksin M1;  
 V<sub>f</sub> adalah volume akhir eluat yang dilarutkan kembali (µL);  
 V<sub>i</sub> adalah volume eluat yang diinjeksi (µL); dan  
 V<sub>s</sub> adalah volume sampel yang dielusikan ke dalam kolom IAC (mL);





## Bibliografi

Association of Official Analytical Chemists. 2005. AOAC Official Method 971.21, Mercury in Foods, Atomic Absorption Spectrophotometric Method, 18<sup>th</sup> Edition, Chapter 9.2.22.

Association of Official Analytical Chemists. 2005. AOAC Official Method 986.15, Arsenic, Cadmium, Lead, Selenium, and Zinc in Human and Pet Foods, Multielement Method, 18<sup>th</sup> Edition, Chapter 9.1.01.

Association of Official Analytical Chemists. 2005. AOAC Official Method 999.11, Lead, Cadmium, Copper, Iron, and Zinc in foods: Absorption Spectrophotometry after Dry Ashing, 18<sup>th</sup> Edition, Chapter 9.1.09.

Association of Official Analytical Chemists. 2011. AOAC Official Method 932.06, Fat in Milk Powder. 18<sup>th</sup> Edition, Chapter 33.5.08.

Association of Official Analytical Chemists. 2011. AOAC Official Method 935.41, Sampling of Milk Powder, 18<sup>th</sup> Edition, Chapter 33.5.01.

Association of Official Analytical Chemists. 2011. AOAC Official Method 974.17, Aflatoxin M1 in Dairy Product, 18<sup>th</sup> Edition, Chapter 49.3.01.

Codex Stan 207 – 1999. Codex Standard for Milk Powder and Cream Powder.

Codex Stan 234 – 1999. Recommended Methods of Analysis and Sampling. Milk and Milk Product.

Codex Stan 250 – 2006. Codex Standard for a Blend of Evaporated Skimmed Milk and Vegetable Fat.

Codex Stan 251 – 2006. Codex Standard for a Blend of Evaporated Skimmed Milk and Vegetable Fat in Powdered Form.

Food and Drug Administration. Bacteriological Analytical Manual. 2003. Food Sampling and Preparation of Sample Homogenate. Chapter 1.

ISO 8968-1: 2001, *Milk – Determination of nitrogen content – Part 1: Kjeldahl method*. 1<sup>st</sup> Edition.

ISO 6731: 2010, *Milk, cream and evaporated milk – Determination of total solids content (Reference method)*.

ISO 5739: 2003, *Caseins and caseinates – Determination of contents of scorched particles and of extraneous matter*. 2<sup>nd</sup> Edition.

ISO 5537: 2004, *Dried milk – Determination of Moisture Content (Reference method)*. 1<sup>st</sup> Edition.

ISO 8156: 2005, *Dried milk and dried milk products – Determination of insolubility index*. 2<sup>nd</sup> Edition.

SNI 7385:2009, Batas maksimum kandungan mikotoksin dalam pangan.

USDA. 1951. United States Scorched Particle Standard for Dry Milk.